

NUEVOS PÉPTIDOS, TERPENOS Y ALCALOIDES ANTITUMORALES AISLADOS DE ORGANISMOS MARINOS

Autor: CARLOS URDA PRIETO

Tesis doctoral UDC / 2017

Director: Dra. Dña. Marta Pérez Alvarez

Director: Dr. D. Jaime Rodríguez González

Director: Dr. D. Carlos Jiménez González

Tutor: Dr. D. Carlos Jiménez González

Programa de doctorado en Química Ambiental y Fundamental



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Acta de Tesis

El tribunal, nombrado por el Excmo. Sr. Rector de la Universidade da Coruña para calificar la tesis doctoral titulada “**Nuevos péptidos, terpenos y alcaloides antitumorales aislados de organismos marinos**”

dirigida por los Drs. Marta Pérez Alvarez, Carlos Jiménez González y Jaime Rodríguez González, presentada por D. **Carlos Urda Prieto** y constituido en el día de la fecha por los miembros que subscriben la presente Acta, una vez efectuada la defensa por el doctorando y contestadas las objeciones y/o sugerencias que se le han formulado, ha otorgado por la calificación de:

En A Coruña, a..... de de 2017

EL PRESIDENTE

EL SECRETARIO

EL VOCAL

Firmado

Firmado

Firmado



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Don Carlos Urda Prieto:

Presenta la memoria adjunta, titulada **“Nuevos péptidos, terpenos y alcaloides antitumorales aislados de organismos marinos”** para optar al grado de doctor en Química que ha sido realizado bajo la dirección de los doctores Marta Pérez Alvarez, Carlos Jiménez González y Jaime Rodríguez González en el laboratorio de Productos Naturales de PharmaMar S.A. y en los laboratorios del Departamento de Química Fundamental de la Universidade da Coruña.

A Coruña, a 30 de Junio de 2017.

Fdo. Carlos Urda Prieto

Fdo. Marta Pérez Alvarez Fdo. Carlos Jiménez González Fdo. Jaime Rodríguez González

Doña **Marta Pérez Alvarez**, Jefa del Departamento de Productos Naturales en PharmaMar S.A., Don **Carlos Jiménez González**, Catedrático de Universidad, y Don **Jaime Rodríguez González**, Profesor Titular de Universidad, pertenecientes al Departamento de Química Fundamental (Área de Química Orgánica) de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña,

Certifican:

Que la memoria adjunta, titulada **“Nuevos péptidos, terpenos y alcaloides antitumorales aislados de organismos marinos”** ha sido realizada bajo su dirección por el licenciado en Química Don **Carlos Urda Prieto**, en el Área de Química Orgánica dependiente del Departamento de Química Fundamental.

Considerando que constituye trabajo de Tesis, autorizan su presentación en la Universidade da Coruña para optar al grado de Doctor en Química.

Y para que así conste, expiden el presente certificado en A Coruña, a 30 de Junio de 2017.

A Coruña, a 30 de Junio de 2017.

A Isa por su apoyo,
A mis hijas María e Isabella.

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral no se podría haber llevado a cabo sin la inestimable ayuda y apoyo de PharMamar, en la que llevo casi 12 años. Durante todo este tiempo, todas las personas que han pasado a mi alrededor me han ayudado a crecer como persona y como investigador.

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra Carmen Cuevas, Directora de I+D de PharmaMar, que me dio la oportunidad de unirme a Pharmamar recién acabadas mis prácticas universitarias y me ha permitido realizar esta Tesis.

A mis tres directores de los que he aprendido tanto. A mi jefa, la Dra Marta Pérez (Jefa Departamento de Productos Naturales), que me ha dado la confianza necesaria estos años y que no es consciente de lo que me ha supuesto. A los Doctores Carlos Jiménez y Jaime Rodríguez de los que he aprendido tantas cosas.

A Simon Munt, gerente del área de I+D, que gracias a su colaboración se han conseguido grandes resultados.

Al Dr Rogelio Fernández por su desinteresada ayuda en la determinación estructural y darme muy buenos consejos durante todo este tiempo y que me han permitido mejorar científicamente.

A Santiago Bueno, jefe del departamento de Colección, que siempre ha estado dispuesto a ayudarme con la taxonomía de los organismos marinos.

Al Dr Andrés Francesch por sus consejos que me han ayudado en la escritura de esta Tesis.

A Eli, por conseguirme tan eficientemente las publicaciones y por su cariño.

A mi querido compañero Alfredo que sabe lo que me ha supuesto todo este trabajo y que siempre consigue sacarme una sonrisa.

A todos mis compañeros del departamento de Productos Naturales que me siguen acompañando y que en algún momento han colaborado en este trabajo: Laura, Elena, Ada, Cristina, Guille, Patri y Cris Lillo.

Además, muchos compañeros me han dado fuerza con sus ánimos, así que no puedo olvidarm de ellos: Juanlu, Elena, Juan, Cristina, Fernando, Valen, Aurora....

A mis becarios favoritos Simona, Inés y Pablo.

A mis padres, mis hermanas y mi abuela, que siempre están conmigo.

Por último, a las personas más importantes en mi vida y a las que no he podido dedicarles el 100% durante estos tres años. A ti Isa por entenderme, ahora es tu turno. Y a mi princesa María que no entiende todavía lo que es el sacrificio y el trabajo, los causantes de haberme quitado tiempo junto a ella. Bella, tú tendrás más suerte.

RESUMEN

Esta Tesis Doctoral describe la extracción y fraccionamiento de diferentes invertebrados marinos con el fin de obtener metabolitos que muestren actividad citotóxica. Para la determinación estructural de dichos metabolitos se aplicaron distintas estrategias, así como el uso de distintas técnicas espectroscópicas y de espectrometría de masas. Además, se evaluaron las actividades citotóxicas de los metabolitos aislados.

Capítulo 2: Del estudio de la esponja *Cribrochalina* sp. se aisló pembamida (1), un compuesto peptídico altamente *N*-metilado de origen marino, mostrando actividad citotóxica moderada frente a células tumorales.

Capítulo 3: Un nuevo integrante de la familia de las njaoamines que se denominó njaoamine I (2) se aisló del estudio químico de la esponja *Reniera* sp. Mostró una actividad citotóxica moderada frente a células tumorales.

Capítulo 4: Se reportó por primera vez el estudio químico del coral blando *Protodendron repens* que dio como resultado el aislamiento de dos xenicanos, llamados protoxicina A (3) y B (4) y, que cuya novedad estructural es la presencia de una cadena larga de ácidos grasos.

Capítulo 5: Se aislaron dos nuevos hexapéptidos cíclicos de la ascidia *Lissoclinum bistratum*, bistratamidas M (5) y N (6). Se caracterizan por poseer en sus estructuras anillos de oxazol y tiazol. Estos péptidos cíclicos muestran una actividad citotóxica moderada contra cuatro líneas celulares tumorales humanas. Además, se realizó el estudio de la interacción del ion Zn^{2+} con bistratamida K (7) que dio lugar a la formación de un complejo de Zn^{2+} mononuclear de 7.

Capítulo 6: Daedophamida (8), un nuevo ciclodepsipéptido, se aisló de la esponja *Daedalopelta* sp. Daedophamide mostró actividad citotóxica significativa contra cuatro líneas celulares tumorales humanas.

RESUMO

Esta Tese Doctoral describe a extracción e fraccionamiento de diferentes invertebrados mariños co fin de obter metabolitos que mostren actividade citotóxica. Para a determinación estrutural de devanditos metabolitos aplicáronse distintas estratexias así como o uso de distintas técnicas espectroscópicas e de espectrometría de masas. Ademais, se evaluaron as actividades citotóxicas dos metabolitos illados.

Capítulo 2: Do estudo da esponja *Cribrochalina* sp. illouse pembamida (**1**), un composto peptídico altamente *N*-metilado de orixe mariña, mostrando actividade citotóxica moderada fronte a células tumorales.

Capítulo 3: Un novo integrante da familia das njaoamines que se denominou njaoamine I (**2**) illouse do estudo químico da esponxa *Reniera* sp. Mostrou unha actividade citotóxica moderada fronte a células tumorales.

Capítulo 4: Reportouse por primeira vez o estudo químico do coral brando *Protodendron repens* que deu como resultado o illamento de dous xenicanos, chamados protoxenicina A (**3**) e B (**4**) e, que cuxa novidade estrutural é a presenza dunha cadea longa de ácidos grasos.

Capítulo 5: Illáronse dous novos hexapéptidos cíclicos da ascidia *Lissoclinum bistratum*, bistratamidas M (**5**) e N (**6**). Caracterízanse por posuír nas súas estruturas aneis de oxazol e tiazol. Estes péptidos cíclicos mostran unha actividade citotóxica moderada contra catro liñas celulares tumorales humanas. Ademais, realizouse o estudo da interacción do ion Zn^{2+} con bistratamida K (**7**) que deu lugar á formación dun complexo de Zn^{2+} mononuclear de 7.

Capítulo 6: Daedophamida (**8**), un novo ciclodepsipéptido, illouse da esponxa *Daedalopelta* sp. Daedophamide mostrou actividade citotóxica significativa contra catro liñas celulares tumorales humanas.

SUMMARY

This Doctoral Thesis describes the extraction and fractionation of different marine invertebrates to obtain metabolites that show cytotoxic activity. For a structural determination of the effects of metabolites, different forms of use of various spectroscopic techniques and mass spectrometry are applied. In addition, cytotoxic activities of the metabolites were evaluated.

Chapter 2: From the study of the sponge *Cribrochalina* sp. was isolated pembamide (**1**), a highly N-methylated peptide compound. It showed moderate cytotoxic activity against tumor cells.

Chapter 3: A new member of the family of njaoaminas called njaoamine I (**2**) was isolated from the chemical study of the sponge *Reniera* sp. It showed moderate cytotoxic activity against tumor cells.

Chapter 4: The chemical study of soft coral *Protodendron repens* was reported for the first time, resulting in the isolation of two xenicals, called protoxenicin A (**3**) and B (**4**), and whose structural novelty is the presence of a long chain of fatty acid.

Chapter 5: Two new cyclic hexapeptides from the ascidia *Lissoclinum bistratum*, bistratamides M (**5**) and N (**6**). They are characterized by having in their structures oxazole and thiazole rings. These cyclic peptides show moderate cytotoxic activity against human tumor cell lines. In addition, was performed the study of the interaction of Zn^{2+} with bistratamide K (**7**) that gave rise to the formation of a mononuclear Zn^{2+} complex of **7**.

Chapter 6: Daedophamida (**8**), a new cyclodepsipeptide, was isolated from the sponge *Daedalopelta* sp. Daedophamide showed significant cytotoxic activity against human tumor cell lines.

Contenido

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	3
1.1 Cáncer	3
1.2 Importancia de los productos naturales en el desarrollo de fármacos	5
1.3 Productos naturales marinos	6
1.4 Compuestos antitumorales aislados de esponjas	10
1.5 Compuestos antitumorales aislados de cnidarios	13
1.6 Determinación de la estereoquímica de aminoácidos: métodos de Marfey y avanzado de Marfey	16
1.6.1 Método de Marfey	19
1.6.2 Método avanzado de Marfey	20
1.7 Determinación de estereoquímica absoluta de alcoholes: Método de Mosher	24
1.8 Objetivos	26
CAPITULO 2: ESTUDIO QUÍMICO DE LA ESPONJA <i>Cribrochalina</i> sp.	29
2.1 Antecedentes	29
2.2 Resultados y discusión	33
2.2.1 Identificación y clasificación	33
2.2.2 Extracción y fraccionamiento	34
2.2.3 Aislamiento y purificación	34
2.2.4 Determinación estructural	35
2.2.4.1 Determinación de la estructura plana de pembamida (1).	35
2.2.4.2 Determinación de la secuencia de aminoácidos de pembamida (1)	46
2.2.4.3 Determinación de la estereoquímica absoluta de pembamida (1)	51
2.2.5 Actividad citotóxica de pembamida (1)	61
2.3 Conclusiones	62
CAPITULO 3: ESTUDIO QUÍMICO DE LA ESPONJA <i>Haliclona</i> (<i>Reniera</i> sp.)	65
3.1 Antecedentes	65
3.2 Resultados y discusión	70
3.2.1 Identificación y clasificación	70
3.2.2 Extracción y fraccionamiento	71
3.2.3 Aislamiento y purificación	72
3.2.4 Determinación de la estructura plana de njaoamine I (2)	73
3.2.5 Actividad citotóxica de njaoamine I (2)	83
3.3 Conclusiones	84
CAPITULO 4: ESTUDIO QUÍMICO DEL CORAL BLANDO <i>Protodendron repens</i>.	87

4.1 Antecedentes	87
4.2 Resultados y discusión	93
4.2.1 Identificación y clasificación	93
4.2.2 Extracción y fraccionamiento	93
4.2.3 Aislamiento y purificación	94
4.2.4 Determinación estructural	95
4.2.4.1 Determinación de la estructura plana de protoxenicina A (3)	95
4.2.4.2 Determinación de la configuración relativa y absoluta de la protoxenicina A (3).	104
4.2.4.3 Determinación de la estructura plana de protoxenicin B (4)	106
4.2.4.4 Determinación de la configuración relativa de la protoxenicin B (4).	118
4.2.5 Actividad citotóxica de protoxenicin A (3) y protoxenicin B (4)	132
4.3 Conclusiones	132
Capítulo 5: ESTUDIO QUÍMICO DEL TUNICADO <i>Lissoclinum bistratum</i>.	137
5.1 Antecedentes	137
5.2 Resultados y discusión	144
5.2.1 Identificación y clasificación	144
5.2.2 Extracción y fraccionamiento	144
5.2.3 Aislamiento y purificación	145
5.2.4 Determinación estructural	146
5.2.4.1 Determinación de la estructura plana de bistratamida M (5)	146
5.2.4.2 Determinación de la estereoquímica absoluta de bistratamida M (5)	155
5.2.4.3 Determinación de la estructura plana de bistratamide N (6)	159
5.2.4.4 Determinación de la estereoquímica absoluta de bistratamida N (6)	166
5.2.5 Actividad citotóxica de bistratamida A (5) y bistratamida B (6)	170
5.2.6 Estudios de interacción de bistratamida K (7) con el ión metálico Zn ²⁺	171
5.3 Conclusiones	181
CAPITULO 6: ESTUDIO QUÍMICO DE LA ESPONJA <i>Daedalopelta</i> sp.	185
6.1 Antecedentes	185
6.2 Resultados y discusión	191
6.2.1 Identificación y clasificación	191
6.2.2 Extracción y fraccionamiento	191
6.2.3 Aislamiento y purificación	192
6.2.4 Determinación estructural	193
6.2.4.1 Determinación de la estructura plana de daedophamida (8)	193
6.2.4.2 Determinación de la secuencia de aminoácidos de la daedophamide (8)	204

6.2.4.3 Determinación de la estereoquímica absoluta de la daedophamide (8)	207
6.2.5 Actividad citotóxica de daedophamide (8)	213
6.3 Conclusiones	214
CAPÍTULO 7: PARTE EXPERIMENTAL	217
7.1 Procedimientos generales	217
7.2 Parte experimental Capítulo 2	218
7.3 Parte experimental Capítulo 3	222
7.4 Parte experimental Capítulo 4	224
7.5 Parte experimental Capítulo 5	229
7.6 Parte experimental Capítulo 6	233

Comunicaciones en congresos y publicaciones de de revistas científicass.

ABREVIATURAS

$[\alpha]_D$: Rotación óptica específica

1D: monodimensional

^1H -RMN: RMN de Hidrógeno

^{13}C -RMN: RMN de Carbono

2D: bidimensional

COSY: COrrelation SpectroscopY

δ : Desplazamiento químico en ppm

d: doblete

dd: doble doblete

ddd: doble doble doblete

CH_2Cl_2 : DiCloroMetano

DMSO: Dimetilsulfóxido

ESI: ElectroSpray Ionization

FDAA: Amida 1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-alanina

g: gramo

GI_{50} : Growth Inhibition 50%

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HRMS: High Resolution Mass Spectrometry

HRESIMS: High Resolution ElectroSpray Mass Spectrometry

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Correlation

IC_{50} : Inhibitory Concentration 50%

IR: Infra-Rojo

J : Constante de acoplamiento

JBCA: J-Based Configuration Analysis

J -HMBC: J -resolved Heteronuclear Multiple Bond Correlation

LC_{50} : Lethal Dose 50%

m: multiplete

MeOH: Metanol

mg: miligramo

MHz: Megahercio

min: minuto

mL: mililitro

MS: Mass Spectrometry

MTPA: ácido metoxitri fluorometilfenilacético

***m/z*:** Relación masa carga

NOESY: Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

ROE: Rotating-frame Overhauser Effect

ROESY: Rotating-frame Overhauser Enhancement Spectroscopy

RP: Reverse Phase

s: singlete

t: triplet

T: temperatura

***t_R*:** tiempo de retención

TFA: TriFluoro Acetic acid

TGI: Total Growth Inhibition

TOCSY: TOtal Correlation Spectroscopy

TOF: Time Of Flight

UV: UltraViolet

VLC: Vacuum Liquid Chromatography



Capítulo 1: Introducción

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

El término cáncer engloba un grupo de enfermedades que pueden originarse en cualquier parte del cuerpo y que comienzan cuando las células crecen descontroladamente sobrepasando a las células normales, lo cual dificulta que el cuerpo funcione de la manera que debería. Hay más de 300 tipos de cáncer que reciben, en general, el nombre de los órganos o tejidos en donde se forman, pero pueden también llamarse de acuerdo al tipo de células que los forman. El proceso de división de las células está regulado por una serie de mecanismos de control que indican a la célula cuándo comenzar a dividirse y cuándo permanecer estática. Cuando se produce un daño celular que no puede ser reparado se produce una autodestrucción celular que impide que el daño sea heredado por las células descendientes. Cuando estos mecanismos de control se alteran en una célula, ésta y sus descendientes inician una división incontrolada, que con el tiempo dará lugar a un tumor.

Un 40% de los cánceres se deben a la acción de agentes externos que actúan sobre el organismo, causando alteraciones en las células. Por el hecho de ser externos, son modificables. En el resto de los casos, no se conocen con exactitud los mecanismos por los que se produce y desarrolla el cáncer. Se piensa que puede ser debido a mutaciones espontáneas de los genes o por la acción de algún factor externo que aún no se ha identificado. Actualmente es uno de los principales temas de investigación.

Las opciones y recomendaciones de tratamiento para el cáncer dependen de varios factores, entre ellos, el tipo y estadio del cáncer, los efectos secundarios posibles, así como las preferencias del paciente y su estado

de salud general. Los principales tipos de tratamientos son la cirugía que es el tipo más antiguo de terapia contra el cáncer, la radioterapia que consiste en el uso de rayos X u otras partículas con alta potencia para destruir las células cancerosas, la quimioterapia que utiliza fármacos para destruir las células cancerosas, la terapia dirigida que es un tratamiento que depende de factores específicos del tumor de un paciente, como las mutaciones genéticas o las proteínas que suelen ser características de las células cancerosas, independientemente de la ubicación original del cáncer, la inmunoterapia que es un tratamiento que consiste en utilizar el sistema de defensa (sistema inmune) para destruir las células tumorales. Esto se consigue bien estimulando el propio sistema inmune o bien introduciendo en el organismo sustancias elaboradas en un laboratorio, semejantes a las del sistema inmune, capaces de controlar la enfermedad, la terapia hormonal, tratamiento que hace más lento o detiene el crecimiento del cáncer, y finalmente, el trasplante de células madre para leucemia, mieloma múltiple y algunos tipos de linfoma.

La estrategia quimioterapéutica y la administración de dosis controladas de radioterapia siguen siendo la más empleada a la hora de abordar el tratamiento de tumores sólidos y hematológicos. Dentro del tratamiento de inmunoterapia se encuentra el uso de los anticuerpos monoclonales que se usan actualmente combinados con quimioterapia y radioterapia para aumentar el efecto antitumoral. Rituximab (Rituxan®), bevacizumab (Avastin®), ipilimumab (Yervoy®), trastuzumab (Herceptin®) cetuximab (Erbix®) y alemtuzumab (Campath®), son algunos ejemplos de anticuerpos monoclonales que están en uso para distintos tipos de cáncer. Cuando un anticuerpo monoclonal está unido químicamente a una molécula citotóxica se obtienen los anticuerpos monoclonales conjugados (Antibody-drug conjugate, ADCs). Actualmente existen varios ADCs

aprobados por las agencias regulatorias para el tratamiento de distintos tipos de cáncer entre los que se encuentran ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla®), brentuximab vedotina (Adcetris®) y ozogamicina gemtuzumab (Mylotarg®)

1.2 Importancia de los productos naturales en el desarrollo de fármacos

Desde la antigüedad, los productos naturales han tenido usos terapéuticos en forma de plantas u hongos medicinales, pero actualmente se utilizan versiones mejoradas al haber conseguido aislar el principio activo de la planta o del hongo. Desde que en 1804 se aisló el primer producto natural (morfina procedente de la amapola de opio, *Papaver somniferum*), se extendió por todo el mundo occidental el uso de los compuestos puros en lugar de preparaciones a base de plantas o de hongos. Antes de 1990 aproximadamente el 80% de los medicamentos aprobados en EEUU eran o estaban relacionados con productos naturales y la síntesis química ha puesto a nuestra disposición muchos medicamentos de origen natural en cantidad necesaria para usos terapéuticos, aunque su presencia sea escasa en la naturaleza. Además, en el desarrollo de nuevos medicamentos los procesos semisintéticos, que combinan extractos de fuentes naturales y síntesis química son muy frecuentes. Un ejemplo es el Taxol, usado para tratar a pacientes con cáncer, que se aisló por primera vez de la corteza del tejo del Pacífico, (*Taxus brevifolia*).

La importancia de los productos naturales se refleja en un estudio en el que se analizó el origen los nuevos fármacos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) entre 1981 y 2008. De este estudio se desprende que un 57.7% se corresponden con Productos Naturales, entendiendo como tal a los propiamente llamados así y a sus derivados.

De los productos de origen natural de origen terrestre con actividad antitumoral, de los más conocidos son vinblastina que se aisló de la planta *Catharanthus* de Madagascar y vincristina un alcaloide de la planta floreciente llamada vincapervinca (*Catharanthus roseus*). La epipodophyllotoxina es un isómero de la podophyllotoxina que fue aislado como agente antitumoral de las hojas de varias especies del género *Podophyllum*. Los más recientes agentes terapéuticos derivados de la naturaleza son los taxanos y las camptotecinas. Uno de los programas más importantes en investigación de productos naturales para el tratamiento del cáncer es el paclitaxel (taxol[®]), mencionado anteriormente, y que se aprobó para su comercialización por la FDA en 1993. Dentro del grupo de las camptotecinas se incluye la camptothecina, un alcaloide aislado del árbol ornamental *Camptotheca accuminata* y sus derivados, que son más eficaces y tienen menos toxicidad, topotecan (hycamptin[®]) y irinotecan (Camptosar[®]).

1.3 Productos naturales marinos

Aunque los océanos contienen una biodiversidad muy superior a la de la tierra, los océanos abarcan el 70 % de la extensión del globo y su diversidad biológica el 95 % de la biosfera, su exploración desde el punto de vista de búsqueda de nuevos compuestos químicos apenas se ha iniciado. A lo largo de millones de años, la evolución ha permitido que los organismos marinos desarrollen una variedad de sustancias con actividad biológica que utilizan como mecanismos de supervivencia, defensa, ataque y comunicación. El descubrimiento de estas sustancias ofrece grandes oportunidades para el desarrollo de nuevos fármacos. El gran esfuerzo de instituciones académicas y de investigación de las compañías

farmacéuticas en la bioprospección del ecosistema marino han puesto de manifiesto un significativo número de estructuras dirigidas a convertirse en potenciales candidatos quimioterapéuticos, exhibiendo efectos antitumoral prometedores in vitro y en modelos de cáncer in vivo.

Desde 1986 liderando la investigación y desarrollo que se inspira en el mar para el descubrimiento de moléculas con actividad antitumoral se encuentra la compañía biotecnológica española PharmaMar. La fuerte apuesta de PharmaMar en la investigación y desarrollo ha hecho que sea líder mundial en descubrimiento de antitumorales de origen marino, siendo la primera empresa a nivel mundial en desarrollar y comercializar un antitumoral de origen marino.

La visión de PharmaMar es:

“La creencia de que los océanos tienen importantes secretos médicos que pueden cambiar la forma de tratar el cáncer”.

Es por ello que Pharmamar dispone de la biblioteca de muestras más grande del mundo de macro y microorganismos, con cerca de 200.000 muestras de las que se aíslan productos naturales que representan una porción significativa de la librería de compuesto de PharmaMar. Del estudio de estas muestras se seleccionan los futuros candidatos para ser un medicamento oncológico. El siguiente paso es la protección legal de la propiedad intelectual de los avances científicos realizados a través de la creación de patentes. Llegados a este punto, el proceso se centra en la síntesis química y en diseñar un proceso químico para que en el laboratorio se pueda producir esa sustancia natural que se encuentra en el mar. De este modo se puede disponer de suficientes cantidades de compuesto para la realización de ensayos. En primer lugar, se lleva a cabo en pre-clínica, administrando el compuesto en modelos animales, para ver

tanto su eficacia en distintos tumores como sus efectos secundarios. Y, en segundo lugar, si los resultados de los anteriores estudios son positivos, se inicia la investigación en pacientes con cáncer, es decir, los denominados ensayos clínicos (Fases I a la V).

Actualmente PharmaMar dispone de una cartera de productos (Figura 1) con cuatro moléculas que se encuentran en diferentes fases, desde la fase inicial de ensayos clínicos hasta la fase final de comercialización).

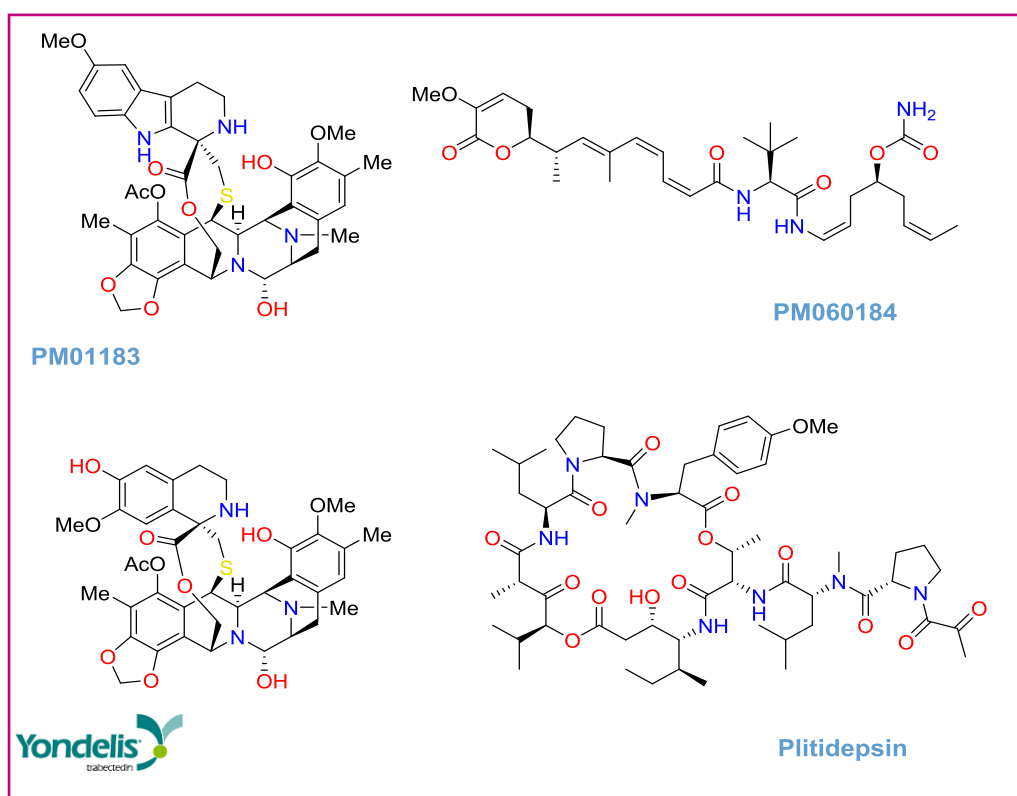


Figura 1. Cartera de productos de PharmaMar: Yondelis®, PM01183, Plitidepsin y PM060184

Yondelis® (trabectedina) es el primer compuesto natural de origen marino que se aprobó para uso oncológico. Fue obtenido originalmente de la ascidia *Ecteinascidia turbinata* y en la actualidad se produce de manera sintética.

En 1969¹ se reportó la impresionante actividad antitumoral in vivo de los extractos de etanol de la ascidia *Ecteinascidia turbinata* que además eran fuertes inmunomoduladores. La primera descripción de la estructura de seis nuevas entidades químicas llamadas ecteinascidinas (ET-729, ET-743, ET-745, ET-759A, ET-759B y ET-770), fueron descritas por el grupo de Rinehart en 1990 y aisladas del tunicado *Ecteinascidia turbinata* recolectado en el mar Caribe y,² en el cual, ET-743 era la ecteinascidina más abundante con un rendimiento del 0.0001%, que indica que a partir de 1000 kg de *Ecteinascidia turbinata* se obtenía solamente 1 mg de trabectedina. Al mismo tiempo, Wright y col,³ describieron ET-729 y ET-734. La novedad de las estructuras de ecteinascidinas consisten en un esqueleto pentacíclico compuesto de dos anillos fusionados de tetrahydroisoquinolina unidos a una lactona de 10 eslabones a través de un puente sulfuro bencílico. La mayoría de las ecteinascidinas poseen un anillo de tetrahydroisoquinolina o tetrahydroxi- β -carbolina adicional.⁴ En la actualidad es producida por semisíntesis a partir del precursor cianosafracina B⁵ a partir de fermentación de pseudomonas marinos.

En el mercado europeo está disponible Yondelis® para el tratamiento de sarcoma de tejidos blandos y cáncer de ovario (en combinación con Doxil) mientras que en Estados Unidos y Japón ha sido autorizado únicamente

¹ Sigel, M. M.; Wellham, L. L.; Lichter, W.; Dudeck, L. E.; Gargus, J. L.; Lucas, L. H. In Food-Drugs From the Sea: Proceedings, 1969; ed. H. W. Youngken, Jr., Marine Technology Society, Washington DC, 1970, 281–294.

² Rinehart, K. L.; Holt, T. G.; Fregeau, N. L.; Stroh, J. G.; Keifer, P. A.; Sun, F. L.; Li, H.; Martin, D. G. *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 4512–4515; Rinehart, K. L.; Holt, T. G.; Fregeau, N. L.; Stroh, J. G.; Keifer, P. A.; Sun, F.; Li, L. H.; Martin, D. G. *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 1676.

³ Wright, A. E.; Forleo, D. A.; Gunawardana, P. G.; Gunasekera, S. P.; Koehn F. E.; McConnell, O. J. *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 4508–4512.

⁴ Cuevas, C.; Francesch, A. *Nat. Prod. Rep.*, **2009**, *26*, 322–337.

⁵ Cuevas, C.; Pérez, M.; Martín, M. J.; Chicharro, J. L.; Fernández-Rivas, C.; Flores, M.; Francesch, A.; Gallego, P.; Zarzuelo, M.; de la Calle, F.; García, J.; Polanco, C.; Rodríguez, I.; Manzanares, I. *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 2545–2548.

en de sarcoma de tejidos blandos, aunque en Estados Unidos ya se encuentra en Fase III para el tratamiento de cáncer de ovario.

Plitidepsin es un compuesto antitumoral de origen marino en fase de investigación obtenido de la ascidia *Aplidium albicans*. Se encuentra en estado avanzado y pendiente de aprobación por las autoridades sanitaria en Europa (EMA) para la indicación de mieloma múltiple.

Zepsyre™ (PM1183, lurbinectedina) es un compuesto de origen sintético derivado de Yondelis cuya diferencia estructural reside en la sustitución de un anillo de tetrahidroisoquinolina por un anillo de tetrahidroxi- β -carbolina.

Actualmente, se encuentra en estudios clínicos en Fase III para cáncer de ovario platino resistente y cáncer de pulmón de célula pequeña. Además, estudios en Fase II se están llevando a cabo para cáncer de mama.

PM184 es un compuesto de origen marino procedente de una esponja conocida como *Lithoplocamia lithistoides*. Actualmente, se encuentra en estudios clínicos en Fase II para cáncer de mama y de Fase I para tumores sólidos.

1.4 Compuestos antitumorales aislados de esponjas

De entre todos los organismos marinos investigados, las esponjas marinas son reconocidas como las fuentes más ricas de productos naturales de origen marino, con cerca de 4851 estructuras hasta la fecha, que contribuyen a casi el 30 % de todos los productos naturales marinos descubiertos hasta el momento. Cabe señalar que, de estas 4851 estructuras, 1499 fueron aisladas en los cinco años que comprende del 2008 al 2012. Esto hace que las esponjas marinas sean los productores

más prolíficos con más de 200 compuestos nuevos reportados cada año durante la última década.⁶

Las esponjas pertenecen al reino animal, Filo Porífera. Contienen varias células especializadas, pero no están organizadas en tejidos y carecen de un sistema de órganos, siendo seres vivos muy simples. Se conocen más de 9000 especies. Son organismos sésiles que se encuentran en agua dulce o salada y de vida muy larga. Se caracterizan por un sistema de alimentación tipo filtro. Poseen una serie de cámaras internas que están conectadas al medio externo y cubiertas con flagelos, cuyos movimientos empujan al agua hacia las cámaras, capturando las partículas contenidas en el agua y, por consiguiente, el 70% de las bacterias suspendidas en la misma. En el medio marino, las esponjas son, hasta el momento, la mayor fuente de metabolitos secundarios marinos bioactivos. Esto puede ser debido a que los producen como una respuesta al medio en el que viven como mecanismo de defensa para evitar su depredación, para competir por el espacio frente a otros organismos y a la simbiosis con otros microorganismos, que en algunos casos pueden constituir hasta un 60 % de su masa.⁷⁻⁸ Existe la sospecha de que estos microorganismos sean los encargados de producir muchas de las sustancias aisladas de las esponjas. Varios ejemplos demuestran las hipótesis de que los microorganismos son los precursores de los metabolitos.⁹ Uno de ellos es rhizoxin que fue aislado de cultivo de *Rhizopus*. Hertweck y col, descubrieron que una bacteria intracelular dentro del género *Burkholderia* era el productor de rhizoxin.¹⁰ Indicios que apoyan este hecho es que la cantidad generada de producto natural se correlacione con la abundancia de

⁶ Mehbub, M. F.; Lei, J.; Franco, C.; Zhang, W. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 4539–4577.

⁷ Hentschel, U.; Piel, J.; Degnan, S. M.; Taylor, M. W. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 641–654.

⁸ Thomas, T. R.; Kavlekar, D. P.; LokaBharathi, P. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 1417–1468.

⁹ Crawford, J.M.; Clardy, J. *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 7559–7566.

¹⁰ Partida-Martinez, L. P.; Hertweck, C. *Nature*, **2005**, *437*, 884–888.

microorganismo en la esponja, que los microorganismos se encuentren en los mismos tejidos de la misma esponja pero que han sido recolectados en distintas localizaciones distantes y, por último, que un mismo metabolito se puede aislar de especies taxonómicamente distintas.¹¹

El interés farmacéutico por las esponjas surgió a partir de 1950 con el descubrimiento de los nucleósidos espongotimidina y espongouridina¹²⁻¹³ en la esponja marina *Cryptotethia cripta*.

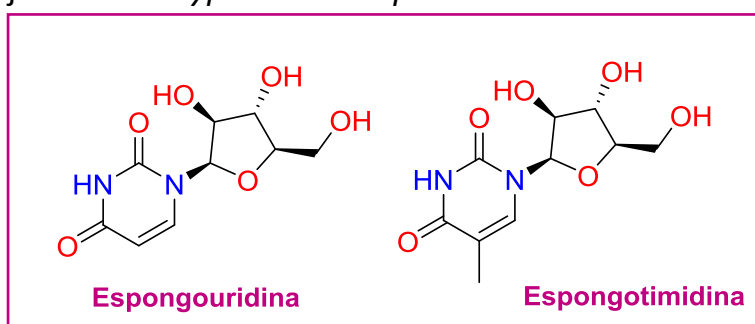


Figura 2. Estructuras de espongouridina y espongotimidina

A partir de entonces, se incrementó el interés en la búsqueda de moléculas con actividad biológica (antiviral, antimicrobiana, citotóxica, antiinflamatoria, etc.) en esponjas marinas.¹⁴⁻¹⁵ Está demostrado que las esponjas marinas son una fuente de compuestos antitumorales, antivirales, antiinflamatorios, antibióticos y otras moléculas bioactivas para usos terapéuticos. En el año 2013, 243 nuevas moléculas fueron descritas del aislamiento de esponjas y, gracias a ello, el Filo Porífera conserva el liderazgo de ser el mayor productor de nuevos compuestos bioactivos marinos.¹⁶

¹¹ Sur, B. C. *CICIMAR Oceánides*, **2011**, 26, 31–46.

¹² Bergmann, W.; Feeney, R. J. *Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 2809–2810.

¹³ Bergmann, W.; Feeney, R. J. *J. Org. Chem.* **1951**, 16, 981–987.

¹⁴ Gómez-Archila, L. G.; Rugeles, M. T.; Zapata, W. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* **2014**, 49, 401–412.

¹⁵ Perdicaris, S.; Vlachogianni, T.; Valavanidis, A. *Nat Prod Chem Res.* **2013**, 1, 1–8.

¹⁶ Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. a.; Munro, M. H. G.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, 32, 116–211.

1.5 Compuestos antitumorales aislados de cnidarios

Los cnidarios pertenecen al reino animal, *Filo* Cnidaria. Se han descrito más de 10.000 especies y casi todas son marinas. Incluyen formas en apariencia tan diferentes como hidroideos, medusas, anémonas y corales. Tienen un nivel de organización tisular ya que están formados por tejidos incipientes en los que las células mantienen una considerable independencia.

De entre los elementos celulares más característicos que poseen, destaca el cnidocito que alberga una cápsula con filamento urticante denominada nematocisto, con función ofensiva-defensiva o para la captura de presas. Dentro del *Filo*, se pueden observar dos tipos morfológicos: el pólipo, que está adaptado a la vida sésil, y la medusa, que lo está a la vida pelágica y libre. Existen especies de cnidarios que sólo presentan la forma pólipo o medusa, mientras que hay otras que a lo largo de su ciclo vital presentan las dos formas, aunque en estadios diferentes. Los cnidarios constituyen un eslabón muy importante en la cadena trófica marina, contribuyendo a la transmisión de energía del sistema pelágico o planctónico al bentónico. Esta energía la emplean en las diferentes reacciones metabólicas, en el crecimiento y la reproducción. El crecimiento supone en algunas especies (madreporarios y octocoralarios) la formación de estructuras duras que dan lugar a uno de los ecosistemas más importantes del planeta, los arrecifes de coral. Las tres clases principales que componen los cnidarios son Hydrozoa, Anthozoa y Sciphozoa.

Desde los inicios del estudio de los compuestos de origen marino, las esponjas han sido reconocidas como el grupo más interesante de invertebrados marinos. Sin embargo, los avances realizados en

bioprospección y screening de hábitats y organismos inexplorados, han permitido aumentar el potencial biotecnológico con el estudio de otros invertebrados marinos, como es el caso del *Filo* Cnidario. Desde 1990 hasta 2011 han sido descritos de este *Filo* un total de 3244 productos marinos, lo que indica que en ese intervalo se ha descubierto un mayor número de moléculas de cnidarios que de esponjas. Muchos de estas estructuras presentan actividad citotóxica. Algunos ejemplos son:

Cladieunicellin B y E presentan actividad citotóxica frente a células de cáncer colorectal (IC_{50} 2.0 $\mu\text{g/mL}$) y frente a leucemia (IC_{50} 2.7 $\mu\text{g/mL}$).¹⁷

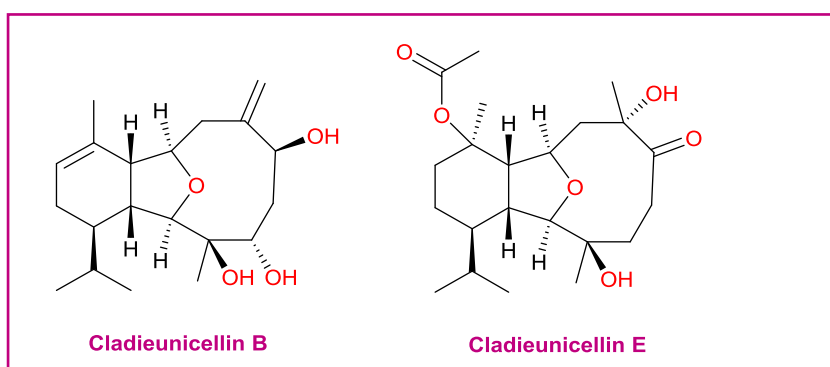


Figura 3. Estructuras de cladeunicellin B y E.

Del coral blando *Dendronephthya rubeola* se aisló capnell-9(12)-ene-8 β ,10 α -diol, que presenta actividad citotóxica frente a leucemia (IC_{50} 0.7 μM) y cáncer de cervix (IC_{50} 7.6 μM).¹⁸

¹⁷ Chen, Y. H.; Tai, C. Y.; Kuo, Y. H.; Kao, C. Y.; Li, J. J.; Hwang, T. L.; Fang, L. S.; Wang, W. H.; Sheu, J. H.; Sung, P. J. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, 59, 353-358.

¹⁸ Grote D, Hänel F, Dahse HM, Seifert K. *Chem Biodivers.* **2008** Sep; 5, 1683-93.

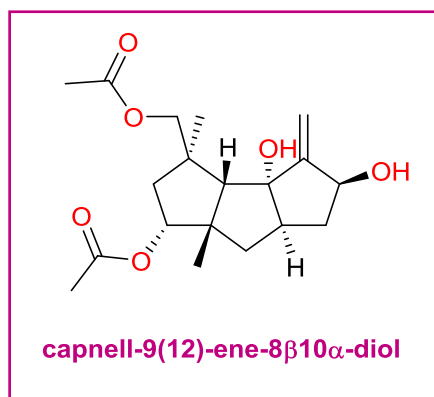


Figura 4. Estructura de capnell-9(12)-ene-8 β ,10 α -diol.

La especie *Klyxum simplex* produce dos diterpenos con actividad citotóxica moderada: klysimplexins B y H.¹⁹ Ambas moléculas exhiben actividad citotóxica frente a varias líneas celulares cancerígenas, entre ellas de pulmón con unos valores de IC₅₀ de 2.0 y de 2.8 μ g/mL respectivamente, y de mama, con IC₅₀ de 6.9 y 4.4 μ g/mL, repectivamente.

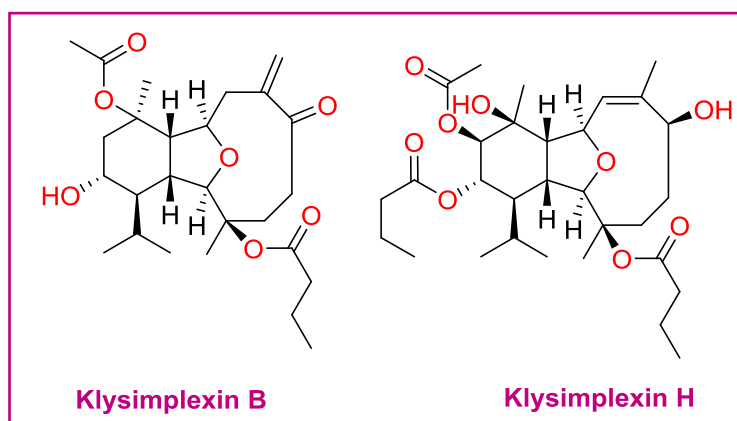


Figura 5. Estructuras de klysimplexin B y H.

¹⁹ Chen, B.W.; Wu, Y.C.; Chiang, M.Y.; Su, J.H.; Wang, W.H.; Fan, T.Y.; Sheu, J.H. *Tetrahedron*. **2009**, 65, 7016–7022.

1.6 Determinación de la estereoquímica de aminoácidos: métodos de Marfey y avanzado de Marfey

La separación de enantiómeros siempre ha sido un desafío analítico para químicos y científicos. Existen dos estrategias principales para la separación cromatográfica de enantiómeros: un método directo y un método indirecto.²⁰

La separación mediante el método indirecto consiste en hacer reaccionar el par de enantiómeros con un agente quiral, formándose diastereoisómeros que se pueden separar por cromatografía HPLC en un medio aquiral.

En el método directo no es necesaria la derivatización química. La separación es posible debido a una asociación reversible diastereomérica entre un medio cromatográfico quiral y los enantiómeros.

El método indirecto presenta una serie de ventajas:

- 1- La separación cromatográfica suele ser sencilla
- 2- El orden de elución puede ser fácil de predecir
- 3- Las columnas aquirales son más baratas y robustas que las quirales
- 4- El tiempo requerido para desarrollar un método es mínimo

Pero el análisis mediante el método indirecto también presenta una serie de desventajas:

- 1- La pureza del agente quiral es esencial, sobre todo cuando se quieren detectar trazas del enantiómero
- 2- Los diastereoisómeros formados pueden no tener la misma absorción UV

²⁰ Bhushan, R.; Brückner, H. *Amino Acids* **2004**, 27, 231–247.

- 3- La racemización del analito puede ocurrir durante el proceso de derivatización
- 4- Los pasos en el proceso de derivatización pueden llevar tiempo
- 5- Posible interferencia del agente de derivatización en el cromatograma

Por lo tanto, la separación de diastereoisómeros por el método indirecto suele ser más simple de realizar y a menudo se obtiene una mejor resolución que por el método directo debido a que las condiciones cromatográficas son más fáciles de optimizar.

Uno de los reactivos que se usan para la derivatización de amino ácidos en el análisis de enantiómeros se denomina reactivo de Marfey, 1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-L-alanina amida (FDAA). Su uso fue reportado por primera vez por Marfey en 1984.²¹

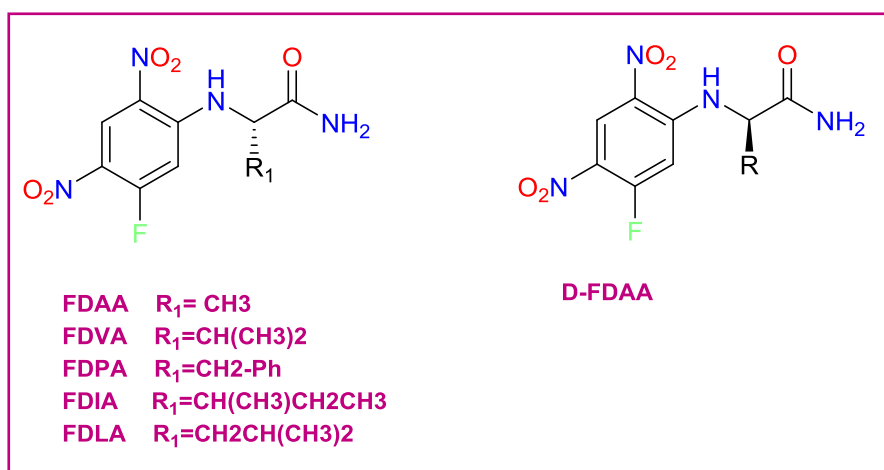


Figura 6. Reactivo de Marfey (FDAA) y derivados.

El reactivo de Marfey, o FDAA, tiene un centro quiral con la configuración L en su grupo de alanina y reacciona por sustitución nucleófila aromática

²¹ Marfey, P. *Carlsberg Res. Commun.* **1984**, 49, 591–596.

del flúor situado en el anillo aromático con el grupo amino libre en un aminoácido, péptido o molécula objetivo. Cuando una mezcla racémica de un aminoácido se trata con este reactivo, la producción de diastereoisómeros que da lugar pueden separarse usando HPLC con una columna aquiral de fase inversa. Esta separación cromatográfica se ha atribuido a la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el hidrógeno del grupo carboxilo y el oxígeno de la carboxiamida en el diastereoisómero L-L, mientras que dicho enlace no se forma o es muy débil en el diastereoisómero L-D (Figura 7). La formación del enlace de hidrógeno en el diastereoisómero L-L se debe a la proximidad del grupo carboxilo del aminoácido con la carboxiamida.²²

El reactivo de Marfey dispone de un grupo cromóforo con un máximo de absorción a 340 nm, con lo que es fácilmente distinguible y permite la detección de pequeñas cantidades de aminoácido.

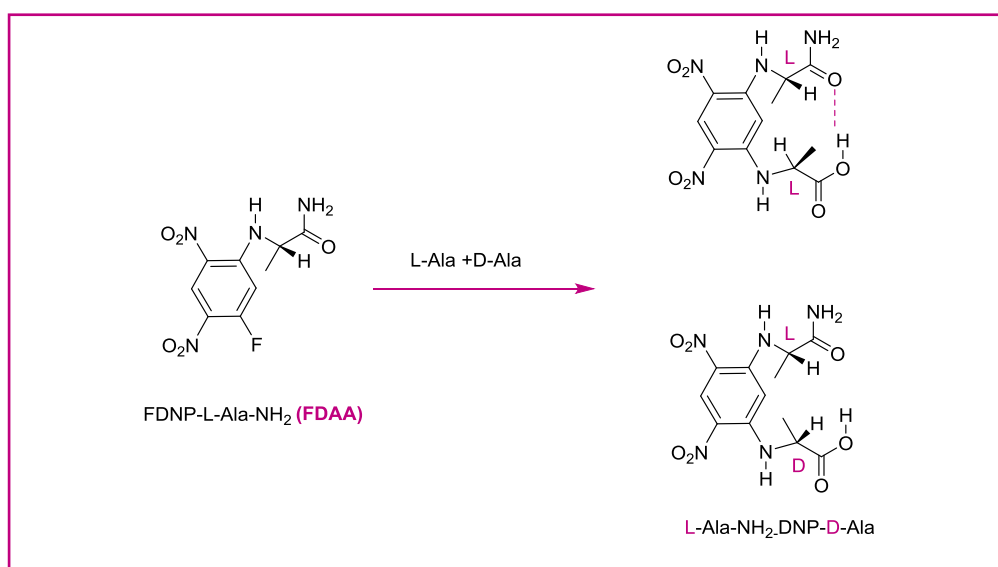


Figura 7. Formación de L-L y L-D diastereoisómeros de la alanina. Enlace de hidrógeno del diastereoisómero L-L.

²² Bhushan, R.; Brückner, H. *Amino Acids* **2004**, 27, 231–247.

1.6.1 Método de Marfey

El procedimiento del método de Marfey consiste en los siguientes pasos (Figura 8):

- 1- Hidrólisis del péptido: Se realiza una hidrólisis ácida del péptido para obtener sus aminoácidos de forma libre.
- 2- Derivatización química de estos aminoácidos libres con el reactivo de Marfey (L-FDAA).
- 3- Derivatización química de los patrones de los aminoácidos objeto de estudio en su forma L y D.
- 4- Diseñar un método de separación de los diastereoisómeros obtenidos.
- 5- Identificación de los aminoácidos mediante LC/MS por monitorización selectiva del ion de relación m/z y posterior comparación de los tiempos de retención con los patrones derivatizados con L-FDAA.

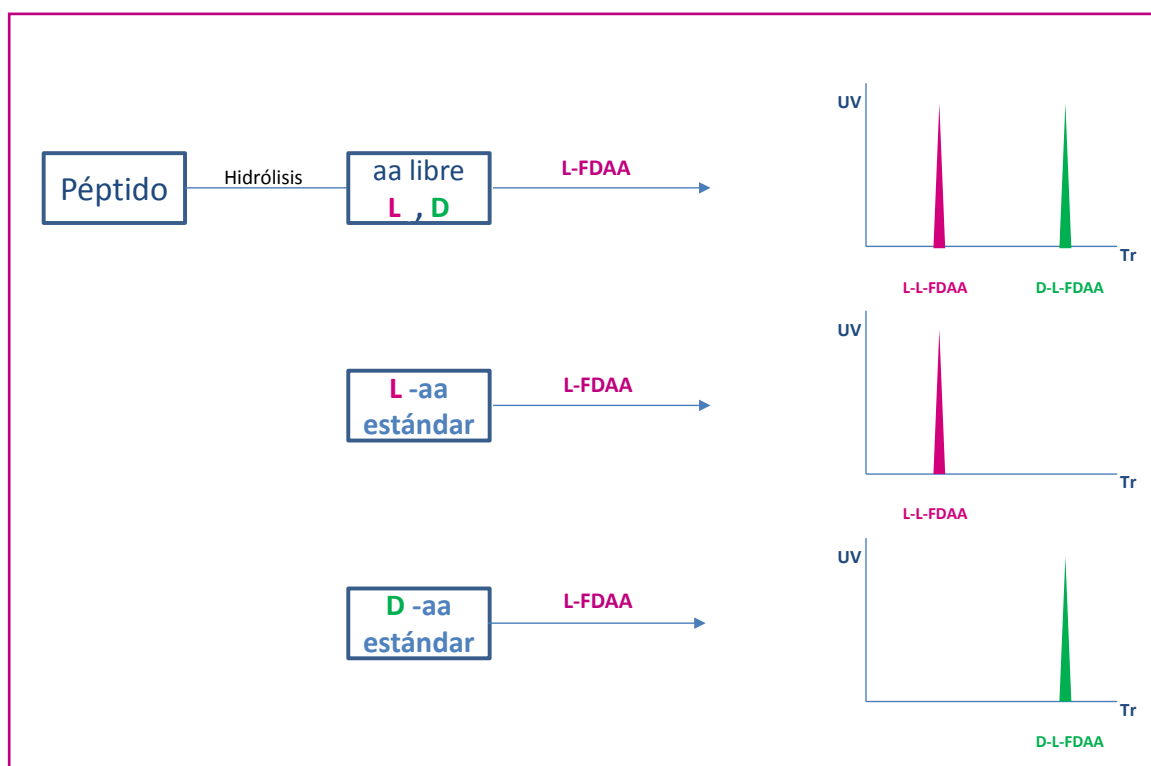


Figura 8. Procedimiento seguido con el método de Marfey.

Una vez obtenido nuestro aminoácido problema libre por hidrólisis ácida del péptido y posterior derivatización, se compara con las configuraciones L y D del patrón de dicho aminoácido. Para ello, previamente se desarrolla un método de separación para ambas configuraciones del aminoácido identificándolos mediante la monitorización selectiva del ion de relación m/z el HPLC-MS y determinando el tiempo de retención determinado para cada configuración. A continuación, se realiza el mismo método de separación al aminoácido problema y se compara el tiempo de retención obtenido con los de los patrones.

1.6.2 Método avanzado de Marfey

Este método se utiliza para determinar la estereoquímica de los aminoácidos sin necesidad de tener los patrones de los aminoácidos. Es muy útil cuando no disponemos en el laboratorio de los patrones o bien hay que sintetizarlos.

Esta metodología se basa en que el diastereoisómero L-L eluye antes que el diastereoisómero D-L en un método de separación por HPLC.²³ La explicación se debe a que en el caso del diastereoisómero L-L, el grupo carboxilo del aminoácido se encuentra más próximo al grupo carboxamida que en el caso del diastereoisómero D-L, facilitando la formación del enlace de hidrógeno. La formación de este enlace entre ambos grupos no se produce en el diastereoisómeros D-L, lo que provoca que su molécula presente una forma menos simétrica que se traduce en una mayor interacción con las cadenas hidrocarbonadas del relleno de las columnas

²³ Fujii, K.; Ikai, Y.; Mayumi, T.; Oka, H.; Suzuki, M.; Harada, K. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 3346–3352.

de HPLC de fase inversa, con el consiguiente aumento en el tiempo de retención. En la Figura 9 se muestra la distancia entre el hidrógeno del grupo carboxilo y el oxígeno de la carboxamida para los diastereoisómeros de la valina. Se observa que para el caso del diastereoisómero L-L, esta distancia es menor (8.28 Å) con respecto a la del diastereoisómero D-L (9.92 Å).

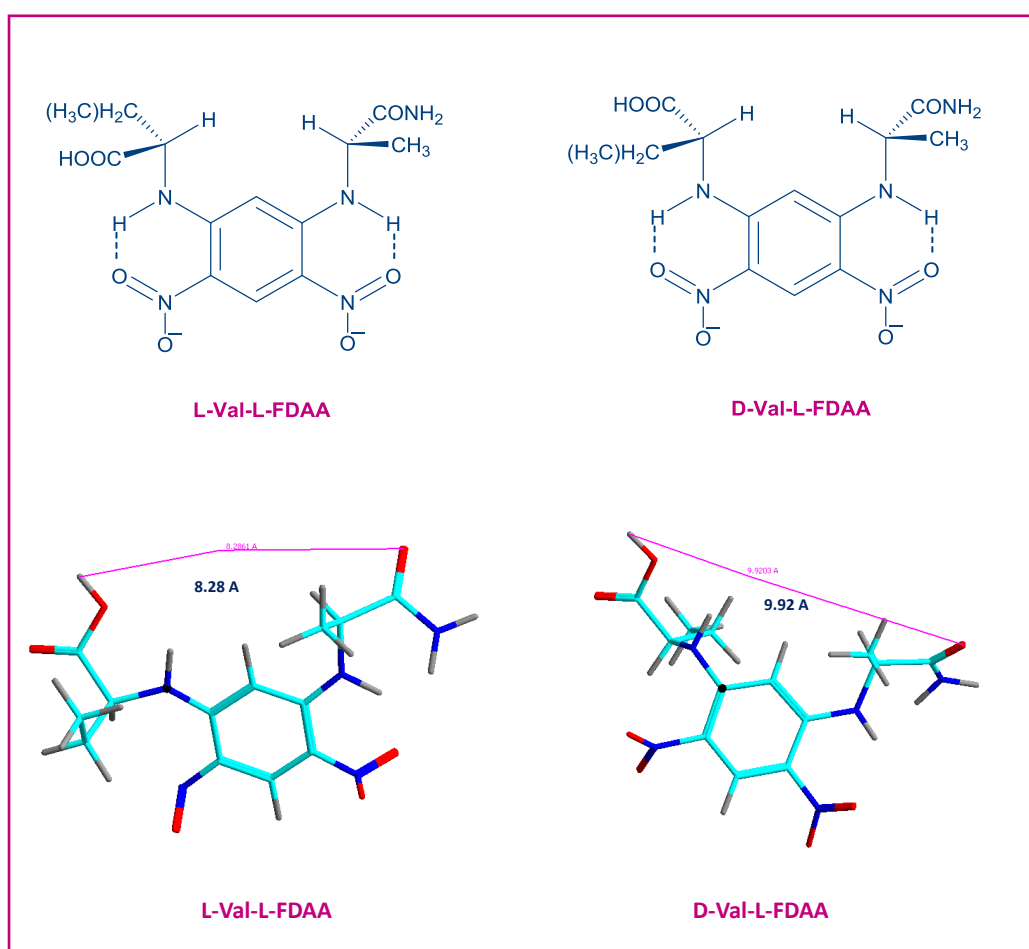


Figura 9. Estructuras de los diastereoisómeros de la valina (L-L y D-L) y distancia entre el hidrógeno y oxígeno de grupos carboxilo y carboxamida.

En 1997 Harada y col,²⁴ publicaron los tiempos de retención de los diastereoisómeros L y D de los aminoácidos más comunes. (Tabla 1)

Tabla 1. Aminoácidos, tiempos de retención (min) de sus diastereoisómeros L y D, orden de elución y diferencia entre los tiempos de retención (min).

Aminoácido	Orden de elución	Tiempo de retención (L) (min)	Tiempo de retención (D) (min)	Diferencia (min)	Aminoácido	Orden de elución	Tiempo de retención (L) (min)	Tiempo de retención (D) (min)	Diferencia (min)
Alanina	L-D	14.8	19.1	4.3	Asparagina	L-D	6.7	7.3	0.6
Ácido 2-amino-n-butirico	L-D	17.9	23.8	5.9	Ácido glutámico	L-D	10.8	13.1	2.3
Norvalina	L-D	24.0	30.4	6.4	Ácido aspártico	L-D	8.2	9.8	1.6
Norleucina	L-D	29.9	36.5	6.6	Lisina (mono- α)	L-D	10.6	10.8	0.2
Valina	L-D	23.2	29.7	6.5	Lisina (di)	L-D	31.4	34.5	3.1
Leucina	L-D	29.6	35.9	6.3	Ornitina (mono- α)	D-L	9.4	8.5	-0.9
Isoleucina	L-D	28.7	35.3	6.6	Ornitina (di)	D-L	28.5	26.0	-2.5
Metionina	L-D	20.2	26.4	6.2	Histidina (mono- α)	D-L	6.7	6.0	-0.7
Fenilalanina	L-D	27.7	33.2	5.5	Histidina (di)	L-D	21.9	25.3	3.4
Tirosina	L-D	37.8	42.6	4.8	Arginina	L-D	9.3	9.6	0.3
Prolina	L-D	15.7	18.2	2.5	Citrulina	D-L	10.7	10.0	-0.7
Serina	L-D	9.2	9.9	0.7	N-metilalanina	—	18.4	18.4	0.0
Homoserina	L-D	9.0	10.5	1.5	N-metilfenilalanina	L-D	30.3	30.9	0.6
O-metilserina	L-D	12.3	17.2	4.9	N-metilvalina	L-D	28.8	32.4	3.6
Treonina	L-D	10.4	14.8	4.4	N-metilisoleucina	L-D	32.8	35.4	2.6
allo-treonina	L-D	10.4	12.3	1.9	Ácido N-metilaspártico	D-L	11.4	9.8	-1.6
Glutamina	L-D	8.8	9.6	0.8					

Se observa que prácticamente el diastereoisómero L de la mayoría de los aminoácidos eluye antes que el diastereoisómero D. El orden de elución varía solamente en los aminoácidos ornitina, histidina (mono α) y citrulina, mientras que para N-metil alanina fue imposible separarlos.

El procedimiento del método avanzado de Marfey consiste en (Figura 10):

- 1- Hidrólisis del péptido: Se realiza una hidrólisis ácida del péptido para obtener sus aminoácidos de forma libre. Se dividen en dos fracciones
- 2- Derivatización química de la primera fracción de estos aminoácidos libres con el reactivo de Marfey (L-FDAA).

²⁴ Fujii, K.; Ikai, Y.; Mayumi, T.; Oka, H.; Suzuki, M.; Harada, K. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 3346–3352.

- 3- Derivatización química de la segunda fracción de los aminoácidos libres con una mezcla racémica del reactivo de Marfey: L-FDAA + D-FDAA.
- 4- Diseñar un método de separación de los diastereoisómeros obtenidos.
- 5- Identificación de los aminoácidos mediante LC/MS por monitorización selectiva del ion de relación m/z . De los dos diastereoisómeros obtenidos de cada aminoácido, el primero que eluye corresponde al aminoácido con configuración L.

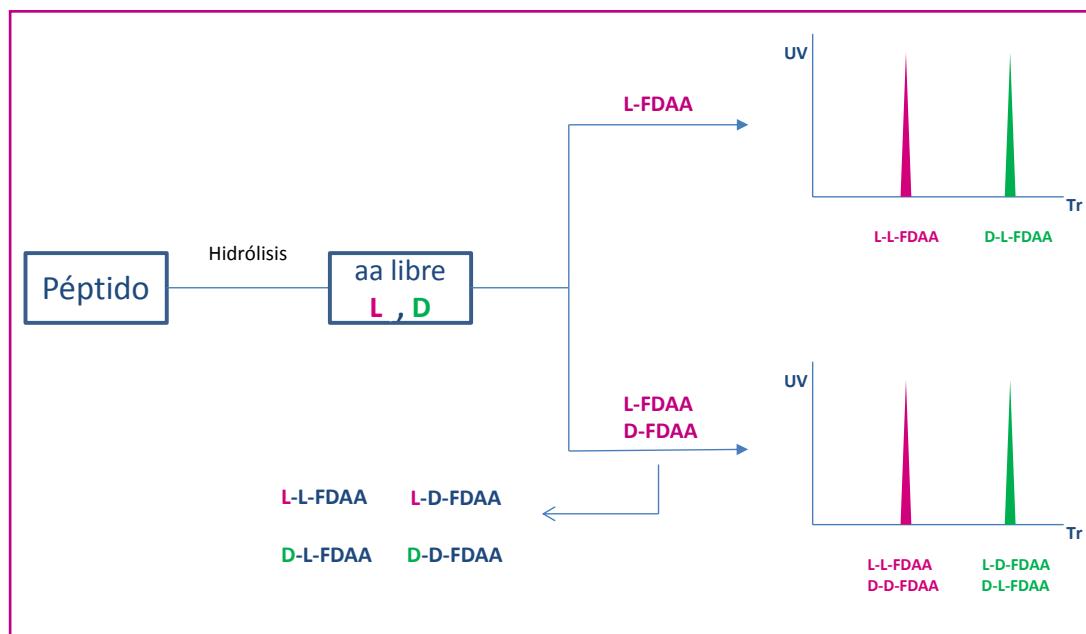


Figura 10. Metodología aplicada para realizar el método avanzado de Marfey.

Como conclusión, cuando disponemos de los patrones de los aminoácidos que queremos analizar, el método de Marfey es el más utilizado para la determinar la estereoquímica de los aminoácidos debido a que es una metodología sencilla y rápida. En aquellas ocasiones que no disponemos de dichos patrones, el método avanzado de Marfey es la alternativa para resolver el problema.

1.7 Determinación de estereoquímica absoluta de alcoholes: Método de Mosher

El método de Mosher utiliza MTPA (ácido metoxitri-fluorofenilacético) o sus derivados como auxiliar quiral (Figura 11) e involucra la comparación de dos espectros de RMN de ^1H . La asignación de la configuración absoluta se basa en el uso de RMN para correlacionar la estereoquímica absoluta del centro quiral del agente auxiliar (de configuración conocida) con el del sustrato (configuración desconocida). Lo que se tiene en cuenta en este caso son los cambios en los desplazamientos químicos de los sustituyentes del carbono asimétrico del sustrato (L1 y L2) en los dos derivados. La diferencia de desplazamientos químicos tendrá signo opuesto en ambos sustituyentes, y dependerá de la estereoquímica absoluta del centro quiral del sustrato. (Figura 12).²⁵

Las características de un reactivo auxiliar quiral son las siguientes:

- Un grupo polar o voluminoso (R1) para fijar la conformación.
- Un grupo funcional (Z) (por ejemplo, un ácido carboxílico) que permita formar un enlace covalente con el sustrato.
- Un grupo (Y) capaz de producir un efecto anisotrópico espacial (por ejemplo, anillo aromático) que afecte selectivamente a los sustituyentes L1 y L2 del sustrato. Este apantallamiento/desapantallamiento asegura que los desplazamientos químicos de L1 y L2 sean diferentes en las dos especies (diasterómeros o confórmeros) que son utilizadas para la determinación de la conformación.

²⁵ Hoye, T. R.; Jeffrey, C. S.; Shao, F. *Nat. Protoc.* **2007**, 2 (10), 2451–2458.

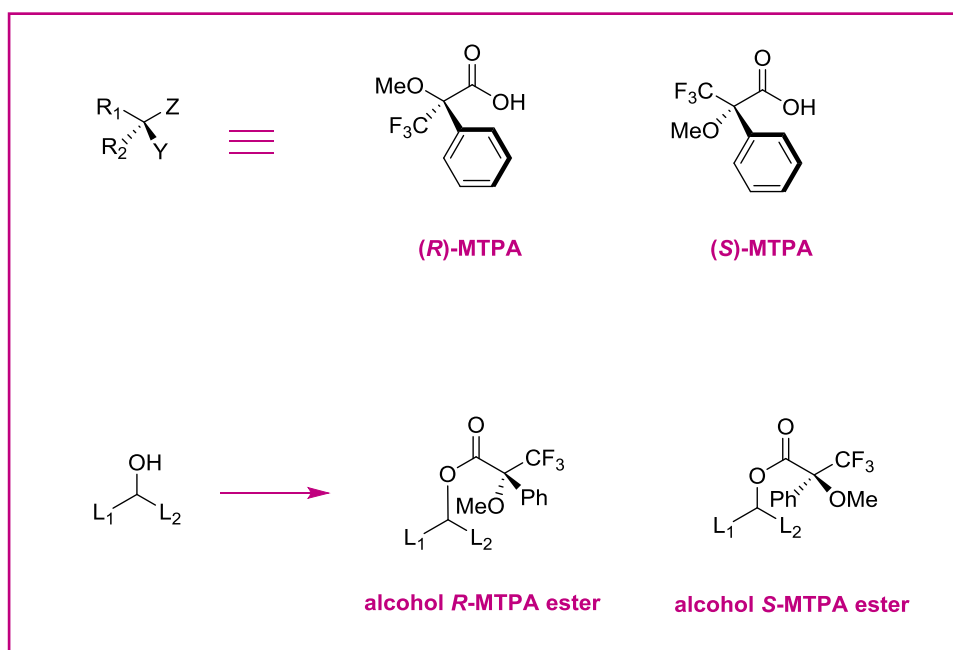


Figura 11. Estructuras de los auxiliares quirales R y S MTPA y estructuras de los esteres resultantes al unirse al alcohol.

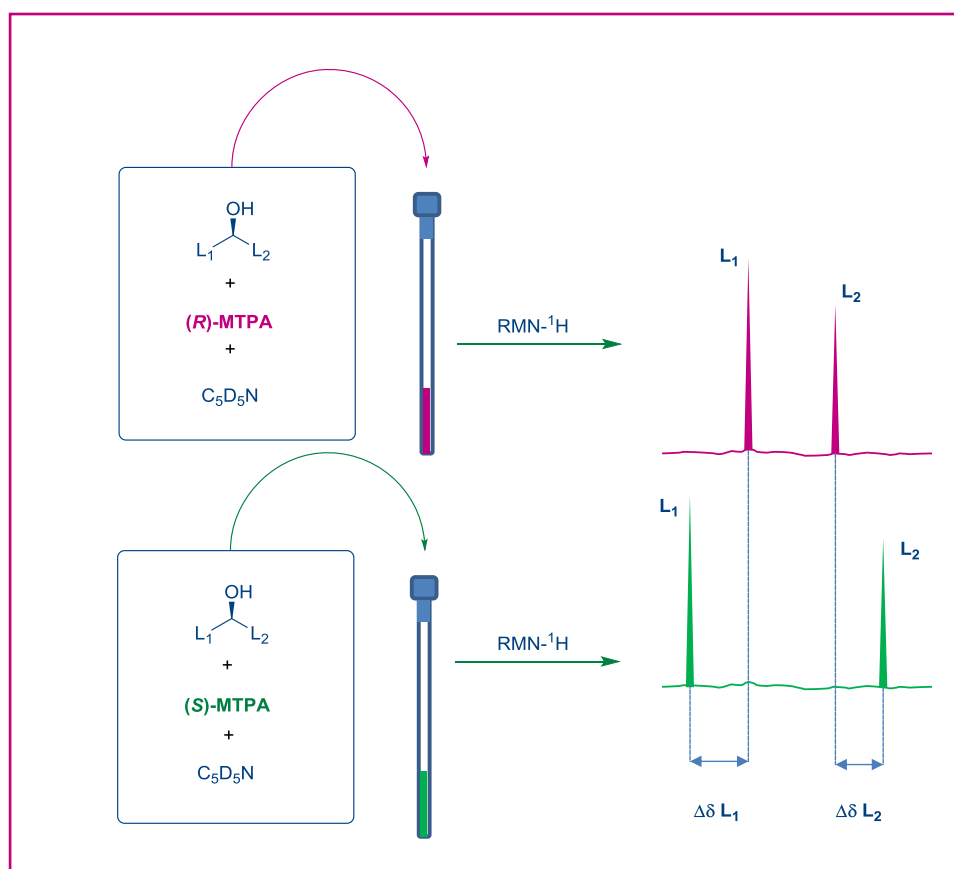


Figura 12. Procedimiento de determinación de la configuración absoluta de un alcohol con un agente derivatizante mediante RMN.

1.8 Objetivos

El objetivo general de esta Tesis consiste en la búsqueda de nuevos agentes antitumorales a partir del aislamiento y caracterización estructural de los metabolitos secundarios obtenidos provenientes de una selección de esponjas, corales, y tunicados y su posterior evaluación antitumoral frente a distintas líneas celulares tumorales. Para ello, en primer lugar, se realiza la extracción y fraccionamiento del organismo marino para la obtención de los metabolitos secundarios. Seguidamente, se lleva a cabo la elucidación estructural mediante el empleo de distintas técnicas como la resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (MS), entre otras.



Capítulo 2: Estudio químico de la esponja *Cribrochalina* sp.

CAPITULO 2: ESTUDIO QUÍMICO DE LA ESPONJA *Cribrochalina* sp.

2.1 Antecedentes

La clasificación taxonómica fue realizada por la Dra. María Jesús Uriz (CEAB-Centro de Estudios Avanzados de Blanes, España) encuadrando el organismo recolectado dentro del género *Cribrochalina* perteneciente al filo Porífera, clase Demospongiae, subclase Heteroscleromorpha, orden Haplosclerida y familia Niphatidae.²⁶

Filo	Clase	Subclase	Orden	Familia	Género
<u>Porifera</u>	Porifera incertae sedis <u>Demospongiae</u> Hexactinellida Homoscleromorpha Calcarea	<u>Heteroscleromorpha</u> Keratosa Verongimorpha	Agelasida Axinellida Biemnida Bubarida Clionaida Polymastiida <u>Haplosclerida</u> Heteroscleromorpha Incertae sedis Merliida Poecilosclerida Desmacellida Scopalinida Sphaerocladina Trachycladida Suberitida Tethyida Tetractinellida Spongillida	<i>Calcifibrospongiidae</i> <i>Callyspongiidae</i> <i>Chalinidae</i> <u><i>Niphatidae</i></u> <i>Petrosiidae</i> <i>Phloeodictyidae</i>	<i>Amphimedon</i> <u><i>Cribrochalina</i></u> <i>Dasychalina</i> <i>Pachychalina</i> <i>Haliclonissa</i> <i>Hemigellius</i> <i>Microxina</i> <i>Niphates</i> <i>Gelliodes</i>

Figura 13. Clasificación taxonómica del género *Cribrochalina*.

Las esponjas pertenecientes al género *Cribrochalina* sp. han sido objeto de numerosos estudios dando lugar al aislamiento de metabolitos con distintas variedades estructurales y con interesantes actividades biológicas.

²⁶ World Register of Marine Species (www.marinespecies.org)

Uno de los metabolitos es duryne²⁷ cuyo aislamiento se publicó en 1987. Se trata de un alcohol poliacetilénico con simetría C_2 formado por una cadena de 30 carbonos, que inhibe el crecimiento de varias células tumorales incluyendo las de leucemia, colon, pulmón y mama.

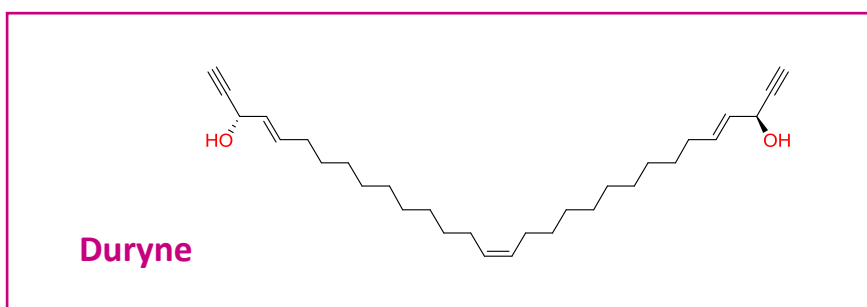


Figura 14. Estructura de duryne aislada de *Cribrochalina* sp.

Otros compuestos representativos son las kapakahinas, una familia de péptidos cíclicos de los cuales la kapakahina B²⁸, que reportada en 1995 presenta actividad citotóxica frente a células de leucemia con un valor de IC_{50} de 5.4 μM .

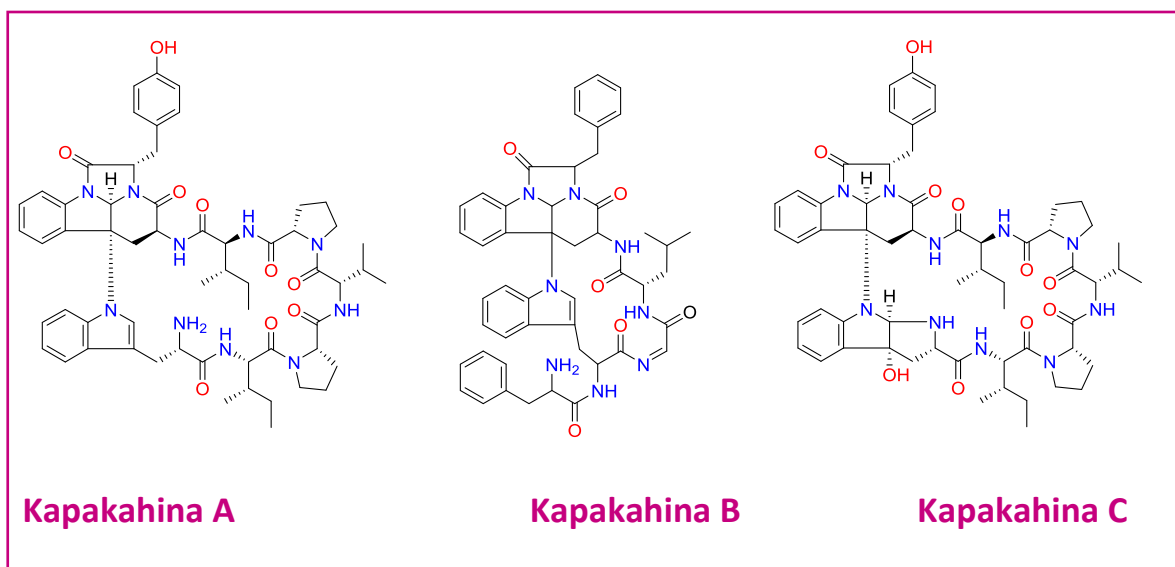


Figura 15. Estructuras de kapakahinas A-C aisladas de *Cribrochalina* sp.

²⁷ Gung, B. W.; Omollo, A. O. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 1067–1070

²⁸ Newhouse, T.; Lewis, C. a.; Baran, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 6360–6361.

La familia de las manzacidinas²⁹ son unos alcaloides con un fragmento bromopirrol, cuyos primeros integrantes fueron publicados en 1991. Este tipo de estructuras presentan una gran variedad de actividades farmacológicas, entre las que se encuentran la inmunosupresora y citotóxica.

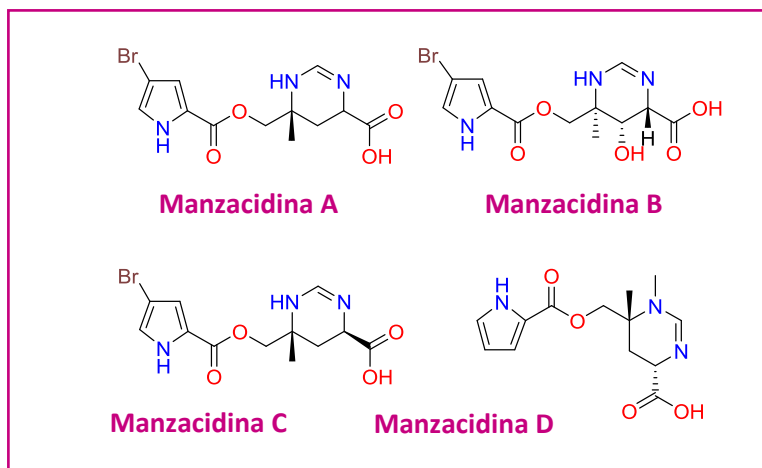


Figura 16. Estructuras de manzacidinas A-D aisladas de *Cribrochalina* sp.

La pyrinadina A cuyo aislamiento fue publicado por Kobayashi y col.³⁰ en 2005, es una alquilpiridina que contiene en la parte central de su estructura un grupo azoxi. Presenta una actividad citotóxica frente a leucemia murina (IC₅₀, 2 µg/mL) y carcinoma epidermoide (IC₅₀ 1 µg/mL) *in vitro*.

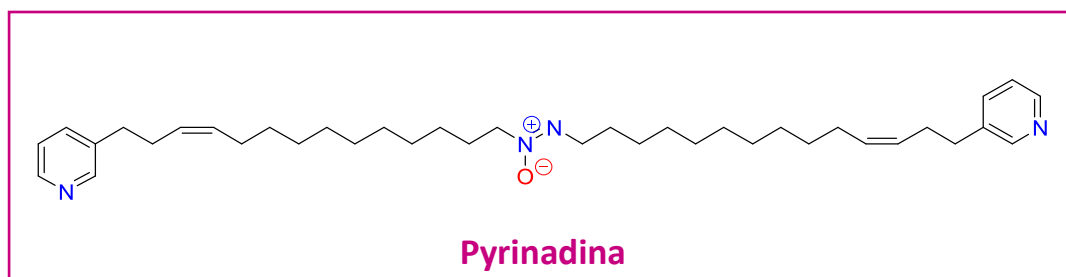


Figura 17. Estructura de pyrinadina aislada de *Cribrochalina* sp.

²⁹ Ohfuné, Y.; Oe, K.; Namba, K.; *Heterocycles* **2012**, *85*, 2617–2649.

³⁰ Kariya, Y.; Kubota, T.; Fromont, J.; Kobayashi, J. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 997–998.

En 1999 Pettit y col. reportaron el aislamiento las cribrostatinas 1 y 2 y de mimosamicina³¹. Estos compuestos presentan actividad antibacteriana y antifúngica.

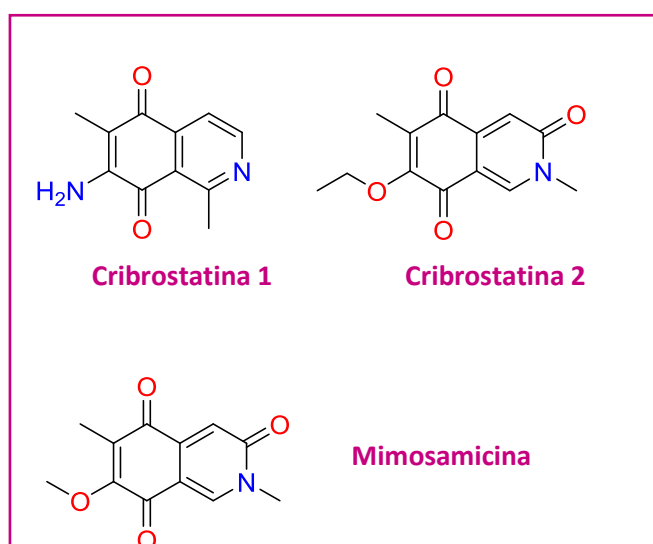


Figura 18. Estructuras de cribrostatinas 1-2 y mimosamicina aisladas de *Cribochalina* sp.

³¹ Pettit, G. R.; Knight, J. C.; Collins, J. C.; Herald, D. L.; Pettit, R. K.; Boyd, M. R.; Young, V. G. *J. Nat. Prod.* **2000**, *1*, 793–798.

2.2 Resultados y discusión

2.2.1 Identificación y clasificación

La esponja *Cribrochalina* sp. fue recolectada por el Departamento de Expediciones de PharmaMar en la Isla de Pemba situada al norte de Tanzania en febrero de 2006 (Figura 19). Fue recolectada a mano y congelada inmediatamente.

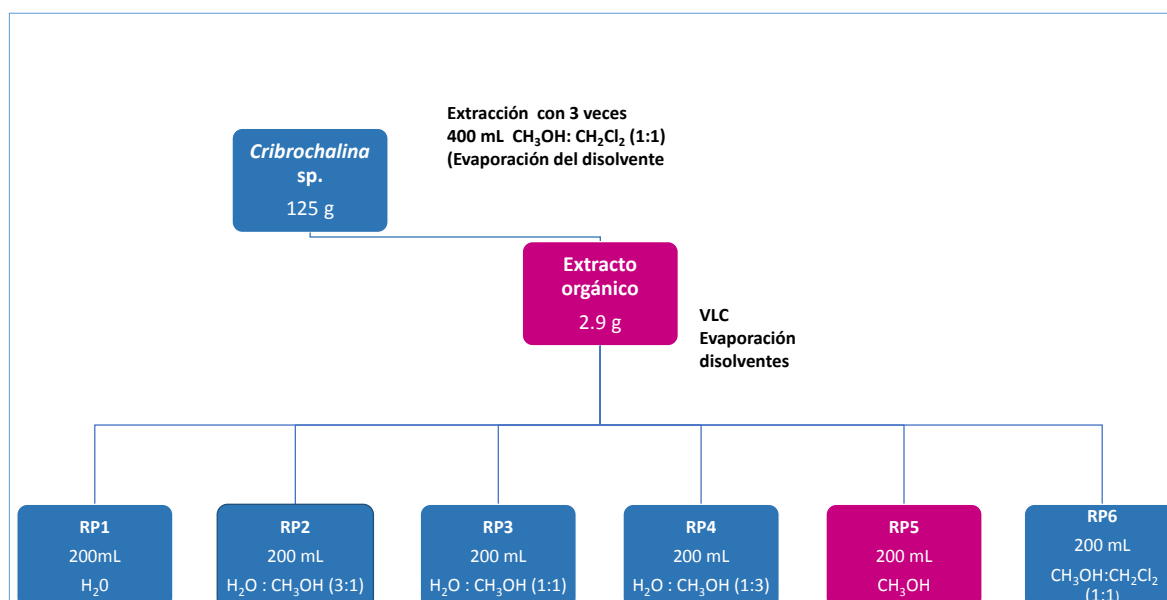
Fue codificada y depositada en PharmaMar con el código ORMA40772. La identificación taxonómica de esta esponja fue realizada por la Dra. María Jesús Uriz del Centro de Estudios Avanzados de Blanes (CEAB).



Figura 19. Fotografía de la esponja *Cribrochalina* sp. y localización de la región donde fue recolectada.

2.2.2 Extracción y fraccionamiento

Con el fin de extraer los metabolitos secundarios causantes de la actividad, la esponja se troceó y se extrajo tres veces con una mezcla de diclorometano:metanol (1:1). El extracto orgánico resultante se fraccionó mediante cromatografía flash a vacío en fase reversa, empleándose como fase móvil distintas mezclas de disolventes en orden decreciente de polaridad, obteniéndose seis fracciones. Cada fracción se sometió a un ensayo de citotoxicidad *in vitro* frente a células tumorales humanas de pulmón mama y colon, mostrando que la fracción eluída con metanol era la más activa.

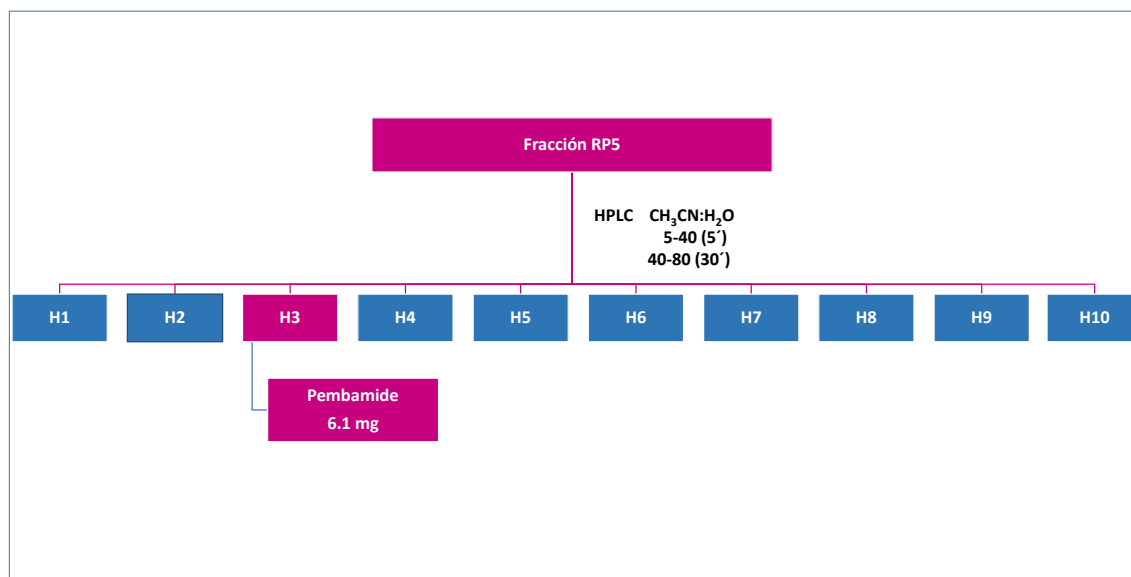


Esquema 1. Fraccionamiento del extracto orgánico de la esponja *Cribrochalina* sp. La fracción RP5 mostró actividad citotóxica contra células tumorales de pulmón, mama y colon.

2.2.3 Aislamiento y purificación

La fracción activa RP5 se separó por HPLC obteniéndose 10 subfracciones. El bioensayo de cada una de ellas mostró que la fracción H3 era la única

que mostraba actividad citotóxica. La posterior purificación mediante HPLC de dicha fracción permitió aislar un compuesto puro que se denominó pembamida (**1**).



Esquema 2. Esquema de aislamiento de pembamida de la fracción de metanol.

2.2.4 Determinación estructural

2.2.4.1 Determinación de la estructura plana de pembamida (**1**).

La elucidación estructural se realizó utilizando técnicas espectroscópicas de RMN mono y bidimensionales, así como espectrometría de masas. El espectro de alta resolución (+)-HRESI-TOFMS muestra el ion $[M + H]^+$ a m/z 895.6596 que se corresponde con la fórmula molecular $C_{46}H_{86}N_8O_9$ (calcd. 895.6596).

La estructura de naturaleza peptídica del compuesto aislado se dedujo de forma inmediata al analizar los espectros de RMN en CD_3OD (Tabla 5). El análisis del espectro de ^{13}C (Figura 32) muestra la presencia de ocho grupos carbonilos con desplazamientos químicos a δ_C 174.6, 174.3, 172.9, 172.2, 172.1, 172.0, 171.8 y 171.2 ppm, atribuibles a funcionalidad de

éster o amida. Además, se observan cinco señales a 31.8, 31.4, 31.3, 31.2 y 31.0 ppm que corresponden a grupos *N*-Metilos y ocho señales entre 64.0 y 49.0 ppm, características de carbonos en posición α en residuos de aminoácidos. Adicionalmente, se observa la presencia de 25 señales entre 5-40 ppm pertenecientes a las cadenas carbonadas alifáticas.

El espectro de RMN- ^1H realizado en CD_3OD (Figura 31) revela la presencia de cinco singuletes a δ_{H} 3.16, 3.15, 3.09, 3.08 y 3.05 ppm, correspondientes a cinco grupos *N*-Me, así como un doblete a 8.07 ppm, característico de un protón amídico que desaparece al intercambiarse con deuterio. También se observa la presencia de ocho señales en la región 5.32-4.30 ppm, características de protones en la posición α de los aminoácidos. Finalmente se observan quince grupos metilo entre 1.45 y 0.77 ppm.

El estudio de los experimentos de RMN 2D realizados incluyeron ^1H - ^1H -COSY, HMBC, HSQC y ^1H - ^1H -ROESY, los cuales nos permitieron establecer la presencia de ocho subestructuras. Las correlaciones a larga distancia observadas en el HMBC a partir de los grupos *N*-Me fueron fundamentales en la elucidación estructural.

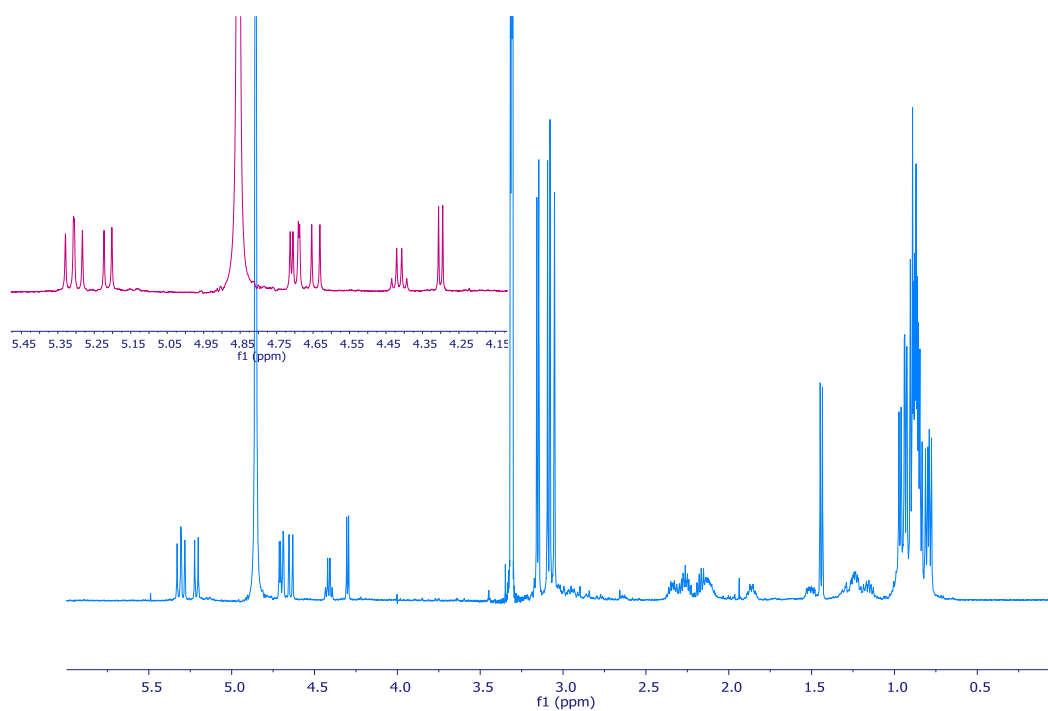


Figura 20. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) y ampliación de las señales correspondientes a los H α de pembamida (**1**).

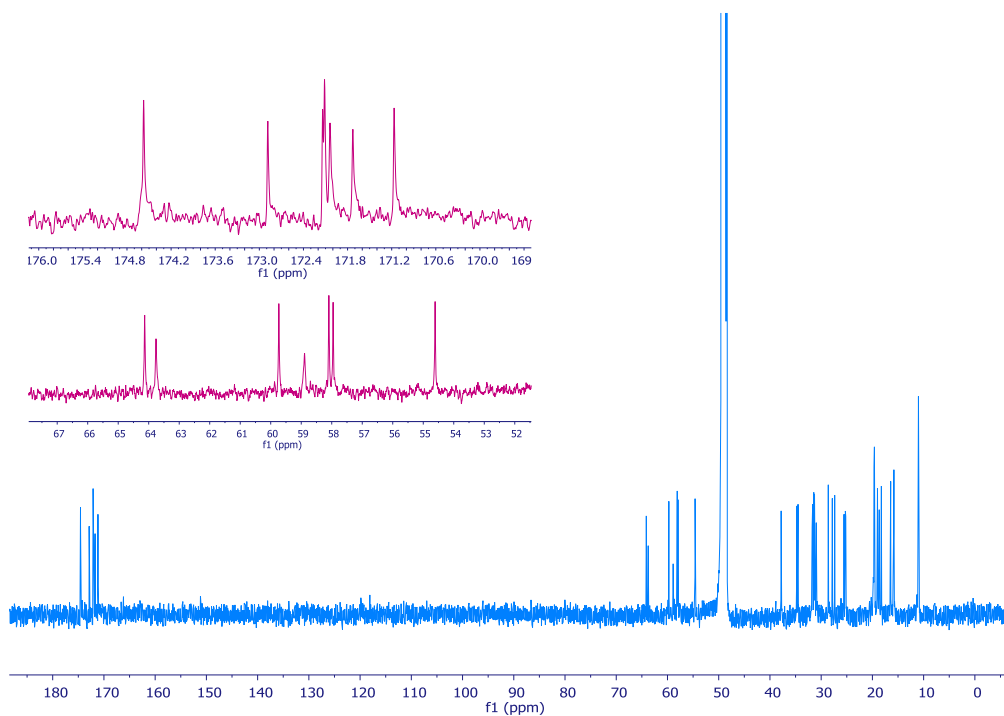
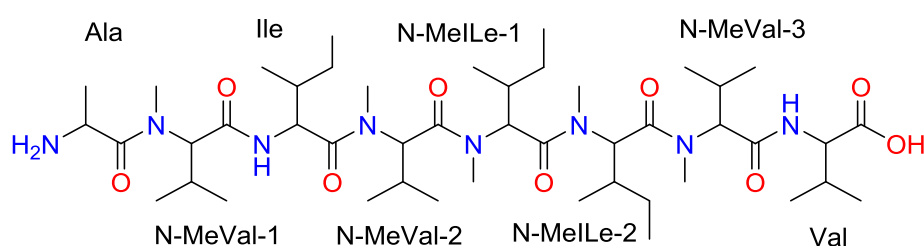


Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, CD_3OD) de pembamida (**1**) y ampliación de las señales correspondientes a los carbonos de los grupos carbonilos y los carbonos en posición en α .

Tabla 2. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C (500 MHz, CD_3OD) de pembamida (1).

Aminoácido		δ_{C} , mult.	δ_{H} , m, J(Hz)	Aminoácido		δ_{C} , mult.	δ_{H} , m, J(Hz)
Ala	NH_2	-	-	N-Melle-1	NMe	31.3, CH_3	3.05, s
	1	171.8, C	-		1	172.1, C	-
	2	49.0, CH	4.42, q, 7.0		2	58.0, CH	5.32, d, 11.5
	3	16.4, CH_3	1.45, d, 7.0		3	34.5, CH	2.09, m
N-MeVal-1					4	25.3, CH_2	1.23, m; 0.96, m
					5	19.6, CH_3	0.85, d
					6	11.0, CH_3	0.85, d
	NMe	31.0, CH_3	3.08, s	N-Melle-2	NMe	31.4, CH_3	3.09, s
	1	171.2, C	-		1	172.9, C	-
	2	64.1, CH	4.65, d, 12.5		2	58.1, CH	5.30, d, 12.0
Ile					3	34.8, CH	2.13, m
					4	25.2, CH_2	1.23, m; 0.96, m
					5	19.0, CH_3	0.85, m
					6	11.0, CH_3	0.86, m
	NH	-	-	N-MeVal-3	NMe	31.8, CH_3	3.15, s
	1	174.6, C	-		1	174.3, C	-
N-MeVal-2					2	63.8, CH	4.70, d, 9.0
					3	27.8, CH	2.24, m
					4	19.7, CH_3	0.96, d, 6.5
					5	19.0, CH_3	0.77, d, 6.5
	NH	-	-	Val	NH	-	8.07, d, 7.0
	1	172.2, C	-		1	172.0, C	-
N-MeVal-1					2	59.0, CH	4.30, d, 5.5
					3	31.7, CH	2.16, m
					4	19.6, CH_3	0.92, d, 6.5
					5	19.8, CH_3	0.92, d, 6.5
	NMe	31.2, CH_3	3.16, s				



Un análisis más exhaustivo de los experimentos de RMN, COSY (Figura 22), HMBC (Figura 24), y HSQC (Figura 23), permite identificar que tres de las ocho subestructuras parciales se corresponden con los aminoácidos alanina, valina e isoleucina, mientras que los otros cinco restantes deben corresponder a aminoácidos *N*-metilados.

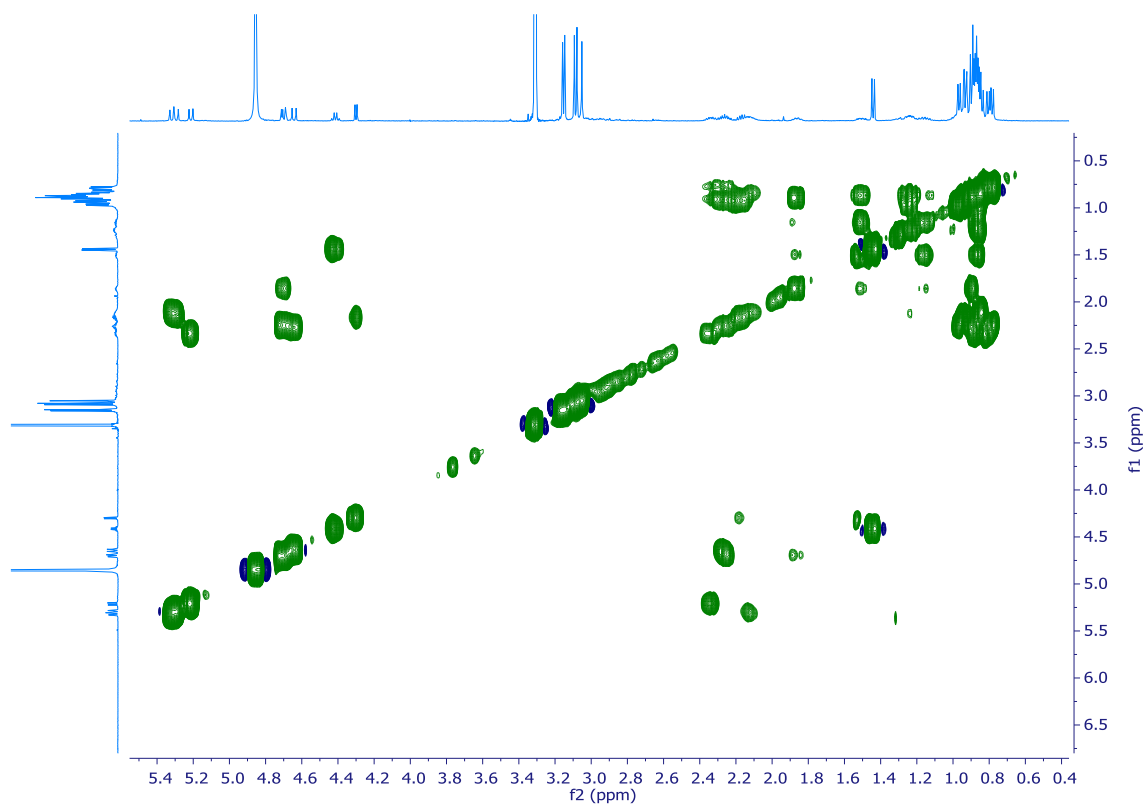


Figura 22. Espectro ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CD_3OD) de pembamida (**1**).

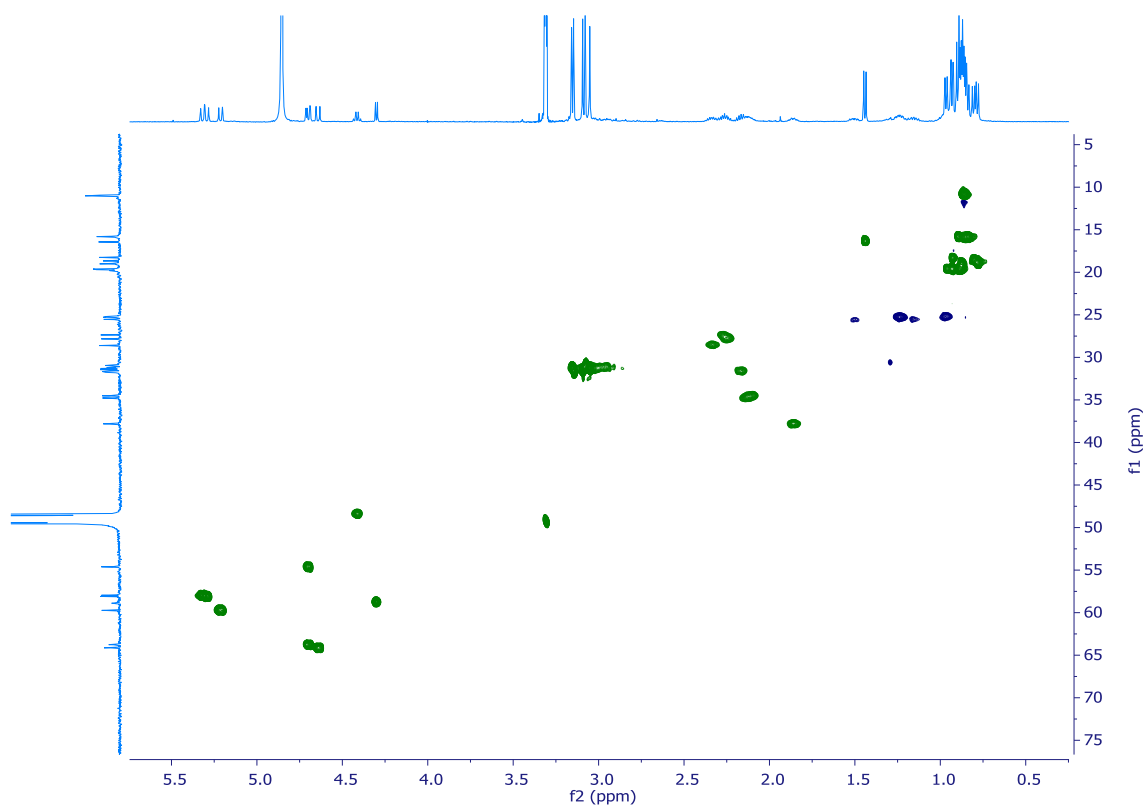


Figura 23. Espectro HSQC (500 MHz, CD_3OD) de pembamida (**1**). Señales de color azul corresponden a grupos metileno.

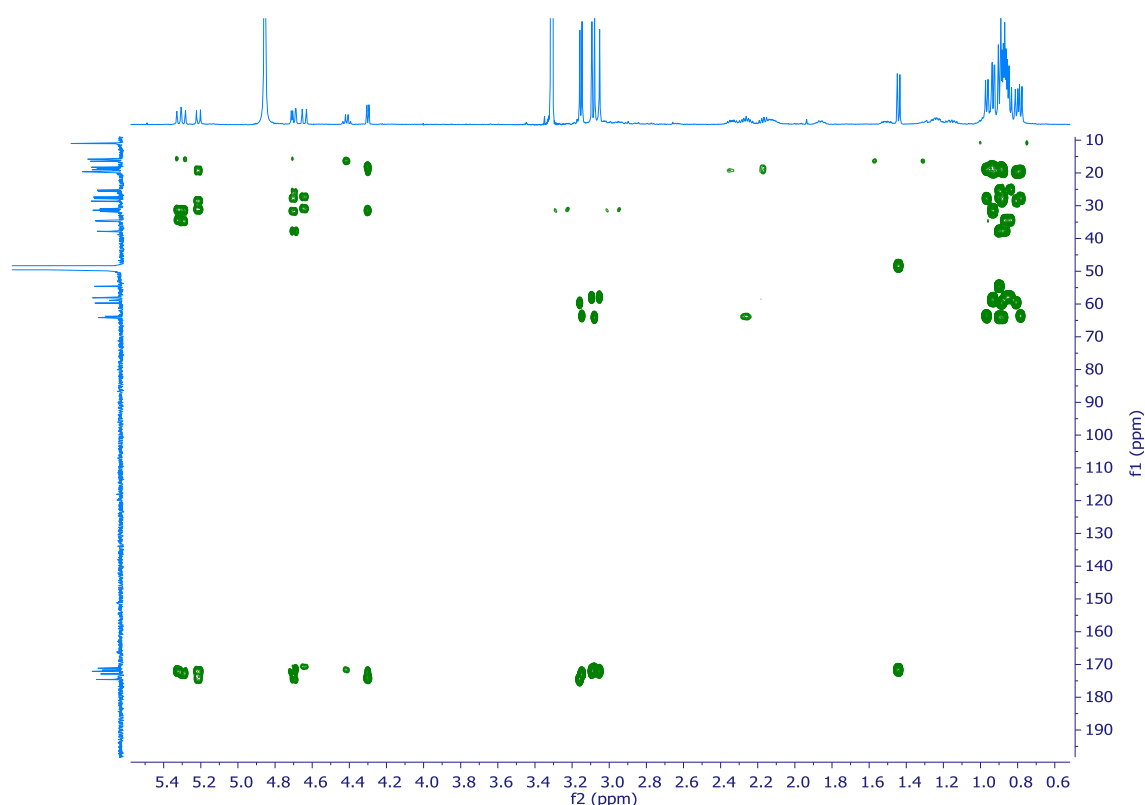


Figura 24. Espectro HMBC (500 MHz, CD_3OD) de pembamida (**1**).

Para la elucidación de la alanina, isoleucina y valina fueron suficientes las correlaciones observadas en los experimentos de RMN ^1H - ^1H -COSY (Figura 26) y 1D TOCSY (Figura 36).

La correlación COSY entre el protón en la posición α a δ_{H} 4.42 ppm y un metilo que resonó como doblete a 1.45 ppm indicó la presencia de una alanina. La presencia del residuo de valina se dedujo a partir de la correlación de la señal correspondiente al protón en α del aminoácido (4.30 ppm) con el metino a 2.16 ppm, que a su vez se acopla con los dos metilos a δ_{H} 0.92 ppm que resuenan como dobletes. El experimento 1D TOCSY confirmó claramente esta secuencia correlativa del residuo de valina. La existencia de un residuo de isoleucina se dedujo de manera similar a partir de los experimentos COSY y 1D TOCSY. Mediante este

último fuimos capaces de observar la correlación de un protón en posición α del aminoácido con el protón metínico a 1.86 ppm que a su vez se correlaciona, por un lado, con un metilo que resuena como doblete a 0.92 y, por otro, los dos protones diastereotópicos metilénicos a 1.17 y 1.52 ppm. Por último, la señal a δ_H 1.52 se acopla con un grupo metilo que resuena como triplete a 0.89 ppm.

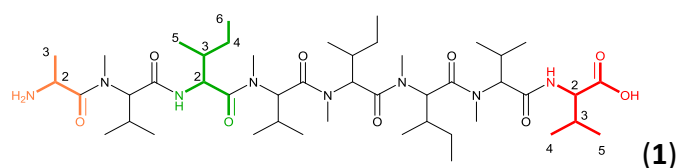
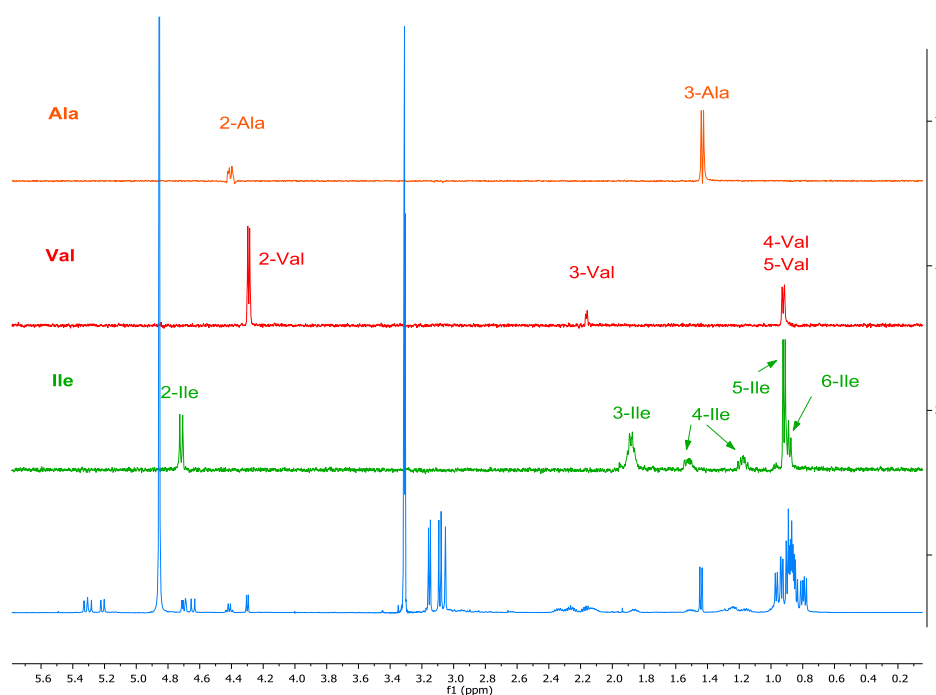


Figura 25. Espectros de irradiación selectiva TOCSY (500 MHz, CD_3OD) para las señales a δ_H 4.42, 4.70 y 4.30 ppm en pembamida (**1**).

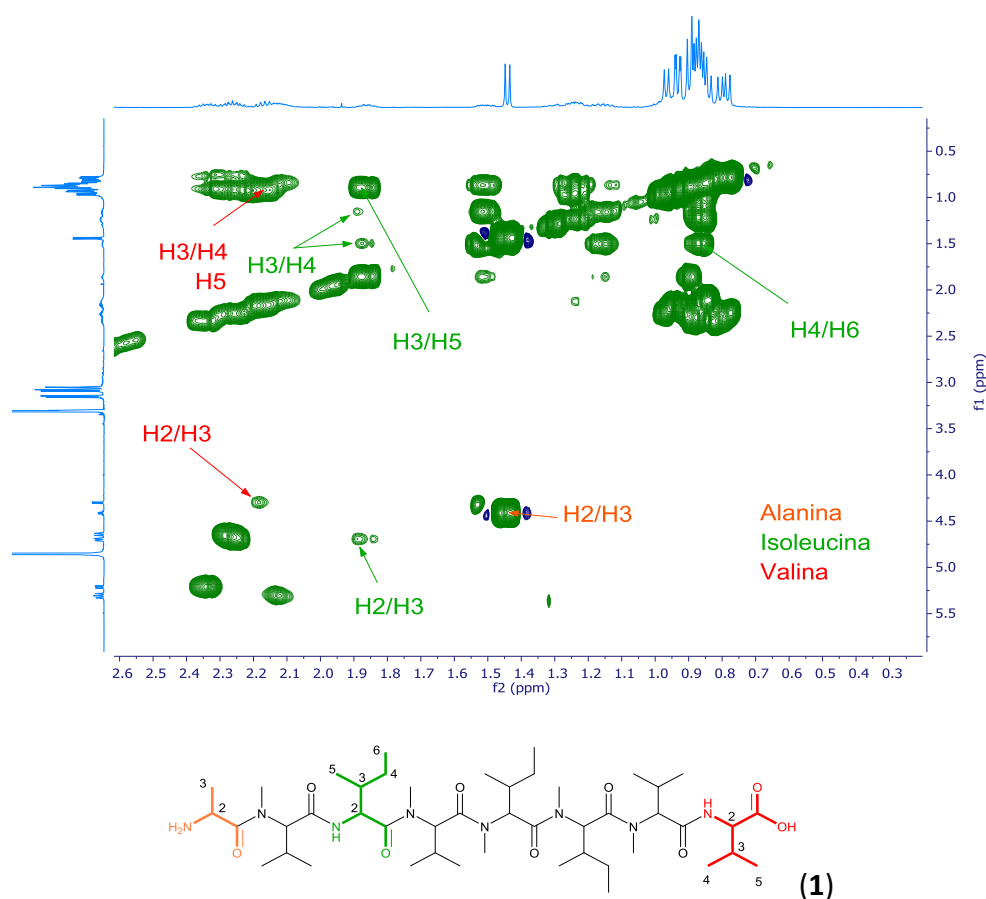


Figura 26. Ampliación del espectro de COSY (500 MHz, CD₃OD) de pembamida (1).

Para la determinación de los fragmentos que contienen unidades *N*-Me, fue necesario realizar un espectro HMBC con el fin de detectar las correlaciones a larga distancia entre los protones de los grupos *N*-Me y los carbonos en posición α de cada aminoácido (Figura 27).

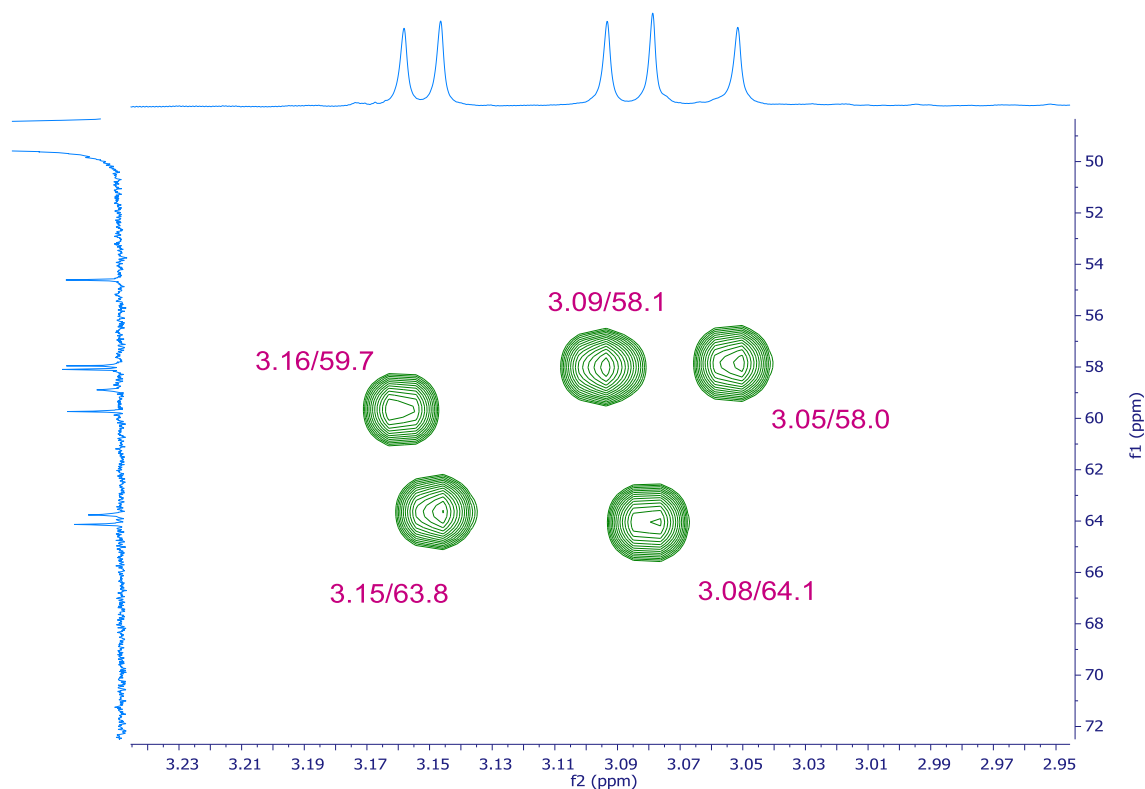


Figura 27. Ampliación del espectro HMBC (500 MHz, CD_3OD) entre los protones de cada grupo *N*-Me y su correspondiente C en α en pembamida (**1**).

La presencia de un residuo de *N*-metilisoleucina en pembamida (**1**) se dedujo a partir de las correlaciones COSY de la señal a δ_{H} 5.32, así como del espectro 1D TOCSY. La secuencia de las correlaciones COSY comienza en dicha señal a 5.32 ppm con un protón metínico a 2.09 ppm que a su vez correlaciona con dos señales, una con un metilo a 0.85 y otra, con dos protones metilénicos a 1.23 ppm. Se concluye la secuencia COSY con la correlación entre este metileno con un metilo a δ_{H} 0.85. Finalmente, el *N*-Me a 3.05 ppm correlaciona en el HMBC con el carbono en posición la α a 58.0 ppm, el cual soporta al protón α a 5.32 ppm, obteniéndose el residuo de *N*-metilisoleucina (*N*-Melle-1).

De la misma forma se determina la siguiente subestructura que también corresponde a un residuo de *N*-metilisoleucina (*N*-Me-Ile-2) cuyos desplazamientos son prácticamente iguales a los de la *N*-Me-Ile-1. En el espectro HMBC se observa las correlaciones de los protones del grupo *N*-Me a 3.09 ppm con el carbono en la posición α a 58.1 ppm, cuyo protón a 5.30 ppm se acopla con el protón metínico a 2.13 ppm. Igual que en el caso anterior, se observan dos correlaciones de este protón metínico: por un lado, con un grupo metilo a 0.85 ppm y, por otro lado, con los dos protones metilénicos a 1.23 ppm, que a su vez correlacionan con un grupo metilo a 0.86 ppm.

Por último, las tres subestructuras restantes se identifican como tres *N*-metilvalinas, usando una combinación de experimentos 2D de HMBC, ^1H - ^1H -COSY, así como experimentos de irradiación selectiva 1D TOCSY.

Los protones del grupo *N*-Metilo a 3.08 ppm correlacionan a larga distancia en el experimento HMBC con el carbono en la posición α a 64.1 ppm, cuyo protón a 4.65 ppm se acopla con un metileno a 2.26 ppm que a su vez correlaciona con dos metilos a 0.89 y 0.87 ppm. Todos estos datos indicaron la presencia de un residuo de *N*-metilvalina al que denominamos *N*-MeVal-1.

El experimento HMBC además muestra la correlación de los protones del grupo *N*-Metilo a 3.16 ppm con el carbono en la posición α a δ_c 59.7, cuyo protón a 5.22 ppm muestra una correlación en el espectro ^1H - ^1H COSY con un grupo metileno a 2.33 ppm. Por último, en este experimento se observa la correlación de los protones de este último con los metilos a 0.88 y 0.80 ppm. De esta información se concluyó la existencia de un segundo residuo de *N*-metilvalina (*N*-MeVal-2).

Finalmente, repitiendo el mismo razonamiento para la señal del grupo *N*-Me a 3.15 ppm con el carbono en la posición α a 63.8 ppm y la correlación de los protones a 4.70 ppm (metino), 2.24 (metilenos) y 0.77 y 0.96 ppm (metilos), indicó la presencia de un tercer residuo de *N*-metilvalina (*N*-MeVal-3).

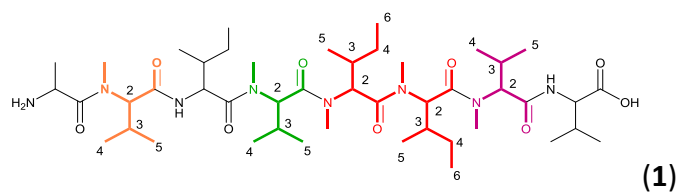
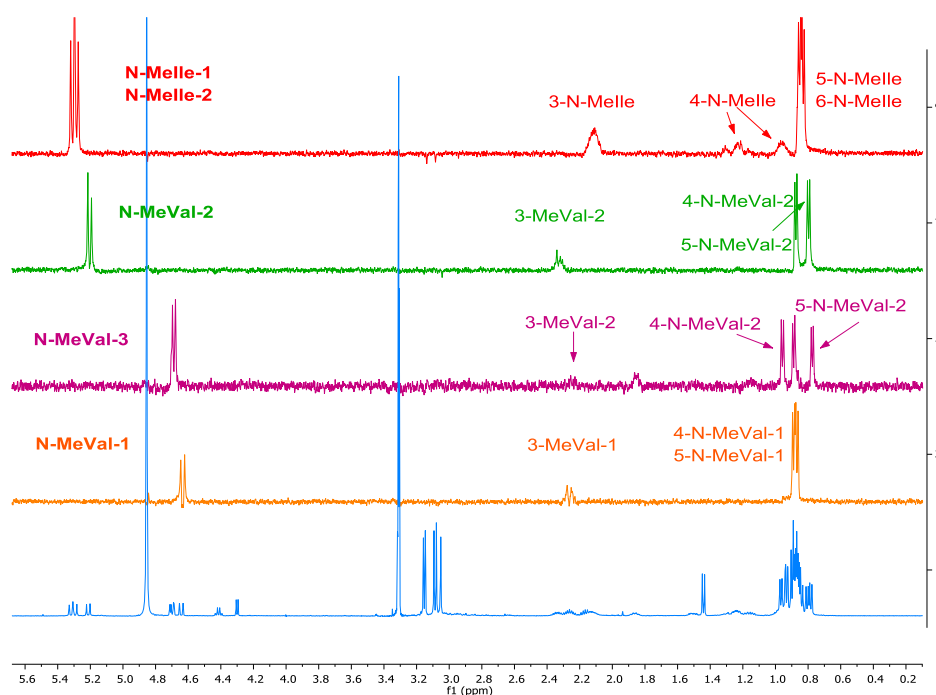


Figura 28. Espectros de irradiación selectiva 1D-TOCSY (500 MHz, CD₃OD) para las señales 5.30, 5.22, 4.70 y 4.65 ppm en pembamida (1).

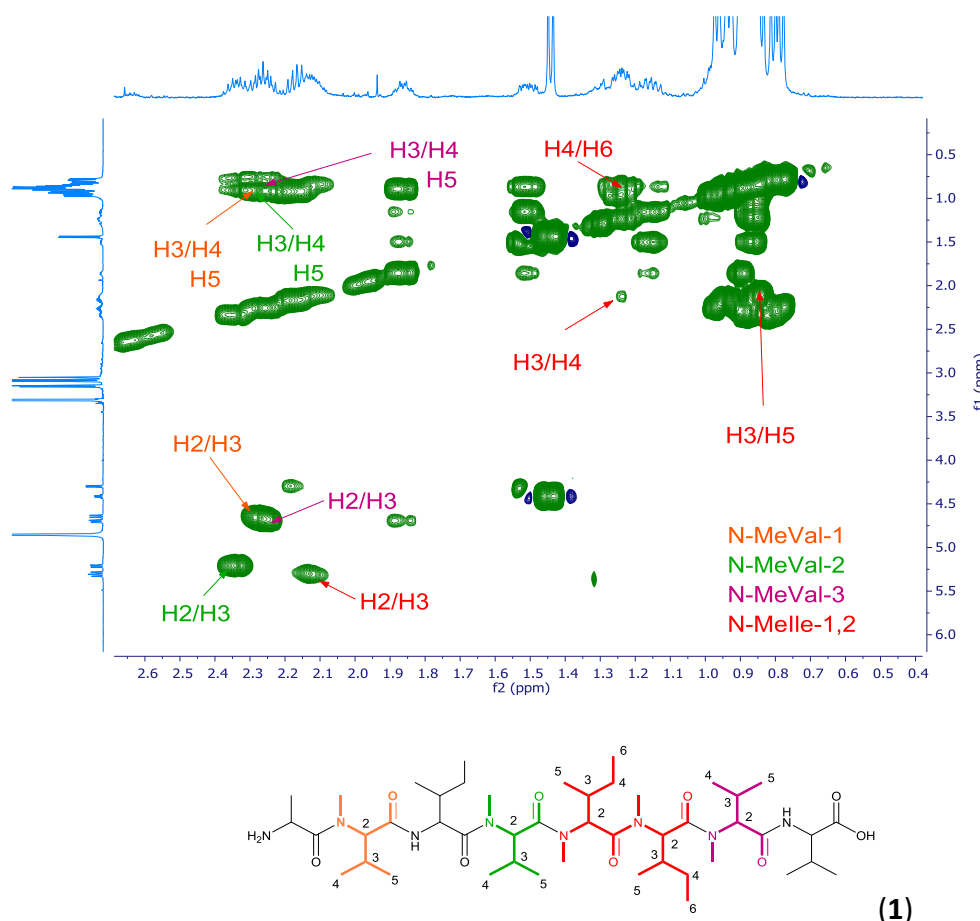


Figura 29. Espectro de ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CD_3OD) de pembamida (**1**).

2.2.4.2 Determinación de la secuencia de aminoácidos de pembamida (**1**)

Una vez deducida que pembamida (**1**) estaba compuesta por ocho residuos de aminoácidos fue necesario establecer la secuencia de éstos. Para ello se hizo uso de la combinación de la información obtenida de los experimentos HBMC (Figura 31) y ROESY (Figura 30) junto con la información aportada por los espectros de masas (Figura 32). Para deducir la secuencia se hizo uso del experimento MS/MS en el que se observó una primera pérdida correspondiente a valina, lo que indicó que este aminoácido está situado en uno de los extremos de la molécula, siendo el punto de partida para el seguimiento secuencial de los aminoácidos por HMBC y ROESY. Las correlaciones a larga distancia entre los protones en la

posición α y/o los grupos N-Me con los grupos carbonilos de los aminoácidos adyacentes, junto con correlaciones ROESY entre los protones α y los grupos N-Me de los aminoácidos colindantes, fueron determinantes en la deducción de dicha secuencia. Dicho estudio dio como resultado la siguiente secuencia de aminoácidos: Ala-N-MeVal-1-Ile-N-MeVal-2-N-Melle-1-N-Melle-2-N-MeVal-3-Val (Figura 31).

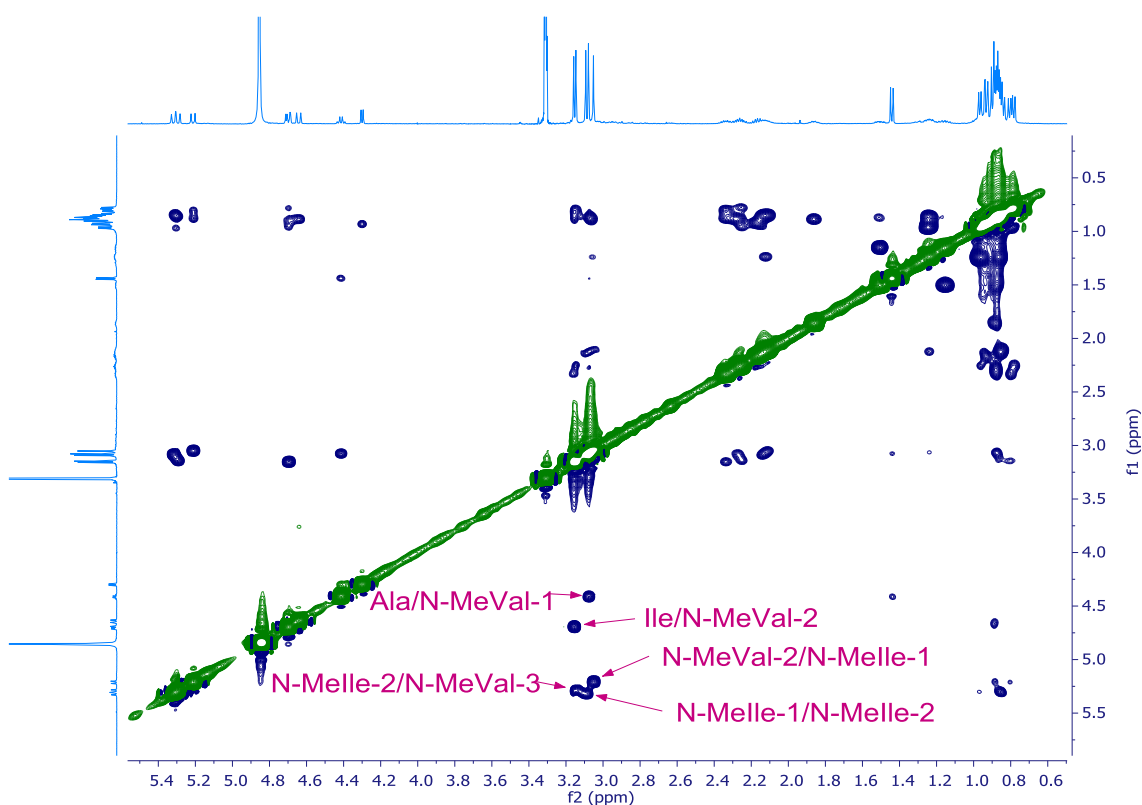


Figura 30. Espectro de ROESY (500 MHz, CD₃OD) de pembamida (1).

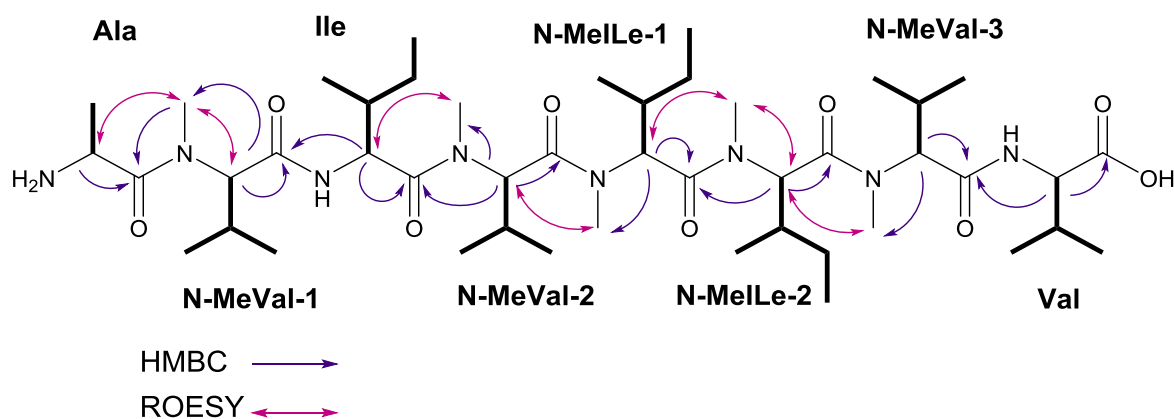


Figura 31. Estructura plana y correlaciones HMBC, ROESY y COSY (500 MHz, CD₃OD) de pembamida (**1**).

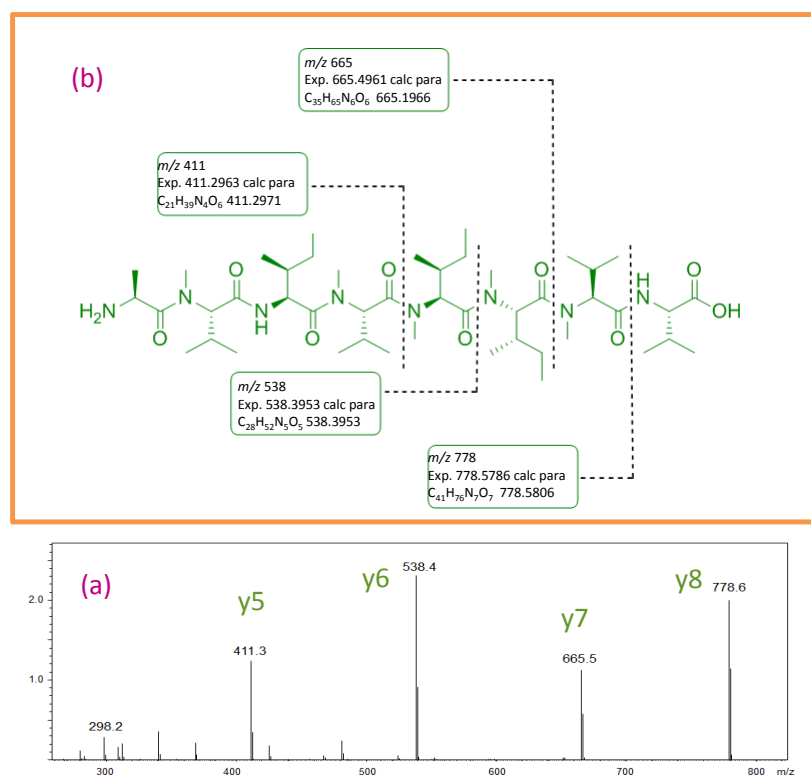
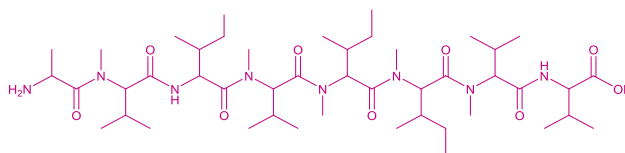


Figura 32. Fragmentaciones observadas en el experimento LRESIMS/MS (a) y HRESIMS/TOF (b) de los fragmentos de pembamida (**1**).

La secuencia propuesta se confirmó mediante la técnica de espectrometría de masas MS/MS, en donde se observa la fragmentación del péptido a lo largo de su esqueleto, obteniéndose dos tipos de fragmentos: iones b e iones y. El espectro de MS/MS consiste en picos que corresponden con la m/z de los distintos iones que, por la diferencia de masa entre ellos, permite calcular la masa del residuo de aminoácido que se ha fragmentado del esqueleto del péptido.

Pembamida (**1**) se empieza a fragmentar por un extremo, obteniéndose el fragmento de ion b1, que coincide con la masa de un residuo de valina, y un fragmento de ion y8, que corresponde con la masa de pembamida menos la masa correspondiente a un residuo de valina. De la misma forma se deducen los siguientes fragmentos de iones que corresponden con pérdida de residuos de aminoácidos y que aparecen por orden de fragmentación, llamados iones y7, y6, y5, etc³²:

³² (<http://www.ionsource.com/tutorial/DeNovo/nomenclature.htm>)



Val-NMeVal-NMelle-NMelle-NMeVal-Ile-NMeVal-Ala (pembamida (1))

b1	Val	NMeVal-NMelle-NMelle-NMeVal-Ile-NMeVal-Ala	y8 (m/z)= 778.5786
b2	Val-NMeVal	NMelle-NMelle-NMeVal-Ile-NMeVal-Ala	y7 (m/z)= 665.4961
b3	Val-NMeVal-NMelle	NMelle-NMeVal-Ile-NMeVal-Ala	y6 (m/z)= 538.3953
b4	Val-NMeVal-NMelle-NMelle	NMeVal-Ile-NMeVal-Ala	y5 (m/z)= 411.2963
b5	Val-NMeVal-NMelle-NMelle-NMeVal	Ile-NMeVal-Ala	y4

El ion a m/z 778.5786 (y8) corresponde a la pérdida de una valina. El siguiente ión positivo que se observó es m/z 665.4961 (y7) que se asigna a la pérdida de los residuos de valina y *N*-metilvalina. A continuación aparece el ion con m/z a 538.3953 (y6) que corresponde con la pérdida del fragmento anterior (y7) y de un residuo de *N*-metilisoleucina. Finalmente, se observó un último ion m/z 411.2963 (y5) que indica la pérdida de otro residuo de *N*-metilisoleucina. La secuencia Val-NMeVal-NMelle-NMelle deducida por MS/MS se confirmó por medio del HMBC y ROESY. Los otros cuatro residuos de aminoácidos no pudieron secuenciarse por MS/MS debido a que no se observaron las fragmentaciones correspondientes.

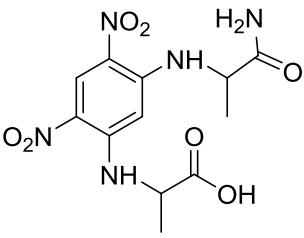
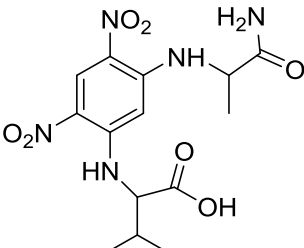
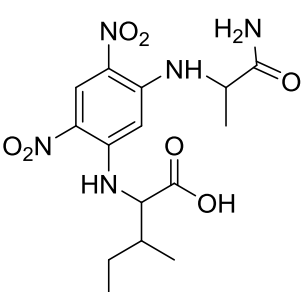
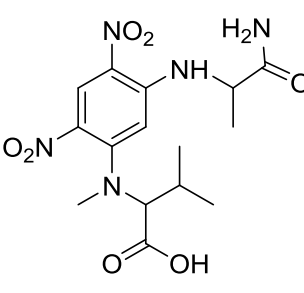
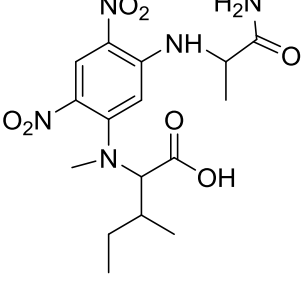
2.2.4.3 Determinación de la estereoquímica absoluta de pembamida (1)

La configuración absoluta de todos los residuos de aminoácidos de **1** se estableció mediante la aplicación del método avanzado de Marfey.³³ Para ello, fue necesario realizar la hidrólisis ácida de **1** para obtener los ocho aminoácidos libres que a continuación se derivatizaron con el reactivo de Marfey (1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-alanina amida (FDAA)). Por un lado, se hicieron reaccionar con el reactivo L-FDAA, y, por otro lado, con una mezcla 1:1 de L-FDAA y D-FDAA. Los aminoácidos derivatizados con Marfey se separaron y se identificaron mediante HPLC-MS a través de la monitorización selectiva de los iones correspondientes a la unión de aminoácido y el reactivo de Marfey (Tabla 6). La ventaja en el método avanzado de Marfey, dado que el aminoácido derivatizado con configuración L posee un tiempo de retención (t_R) menor que el de configuración D.³⁴ La comparación de los t_R en los cromatogramas obtenidos de los aminoácidos derivatizados con L-FDAA con los datos obtenidos en los cromatogramas de la derivatización con la mezcla L-FDAA y D-FDAA nos permitió deducir claramente la mayoría de las configuraciones de los residuos de aminoácidos. De esta forma se pudo determinar la configuración absoluta de cinco residuos correspondientes a una alanina, una valina y tres *N*-metilvalinas. Para la *N*-metilisoleucina y la isoleucina, al poseer cuatros posibles configuraciones L, L-allo, D y D-allo, sólo se pudo determinar si es L o D pero no se pudo especificar si era allo o no. En la Figura 33 se describen las cuatro configuraciones de la *N*-metilisoleucina, las cuales son idénticas a la de la isoleucina, debido a que la diferencia entre la *N*-metilisoleucina y la isoleucina se encuentra en que éste último no posee el grupo *N*-metilo..

³³ Harada, K.; Fujii, K.; Hayashi, K.; Suzuki, M.; Ikai, Y.; Oka, H. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 3001–3004.

³⁴ Fujii, K.; Ikai, Y.; Mayumi, T.; Oka, H.; Suzuki, M.; Harada, K. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 3346–3352.

Tabla 3 . Estructura, peso molecular e ion $[M+H]^+$ de los aminoácidos derivatizados de pembamida (1).

Aminoácido (aa)	Estructura aa + FDAA	Peso molecular aa	Peso molecular aa + FDAA	Ión $[M+H]^+$ HPLC-MS
Alanina		89	341	342
Valina		117	369	370
Isoleucina		131	383	384
N-Me-Valina		131	383	384
N-Me-Isoleucina		145	397	398

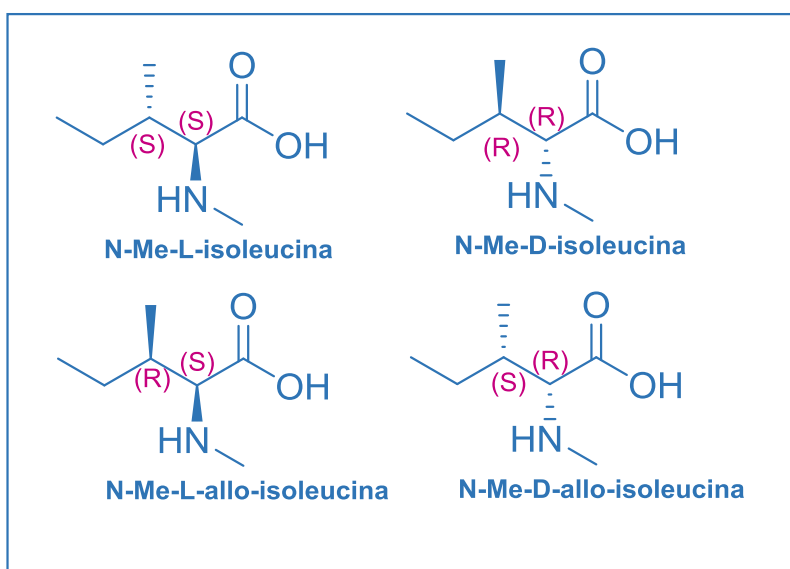


Figura 33. Configuraciones posibles para *N*-Metilisoleucina.

A-Derivatización con L-FDAA. Para el caso de los aminoácidos derivatizados con L-FDAA (Figura 34), el monitoreo selectivo del ion $[M+H]^+$ de relación m/z 342 resultó en la obtención de un pico con un t_R a 6.4 min que se identificó como alanina. De igual forma, la monitorización selectiva de los iones $[M+H]^+$ de relación m/z 370 y m/z 398 dieron unos t_R de 11.7 y 17.3 min respectivamente, que se identificaron como valina ($t_R=11.7$ min) y *N*-metilisoleucina ($t_R=17.3$ min). Finalmente, la del ion $[M+H]^+$ a m/z 384, dio lugar a dos picos con t_R de 14.4 y 14.7 min que corresponden a los aminoácidos *N*-metil-valina e isoleucina ya que ambos poseen el mismo peso molecular. Para distinguir ambos aminoácidos se estudiaron sus espectros UV (Figura 35) que debían ser diferentes debido a la presencia del grupo *N*-metilo en *N*-metilvalina.³⁵ Así, muestra que el máximo de absorción es 360 nm para *N*-metilvalina y de 335 nm para la isoleucina. De esta forma, se pudo distinguir a que aminoácidos correspondía cada t_R , asignándose para la *N*-metilvalina el de 14.4 min y para la isoleucina el de 14.7 min.

³⁵ Fujii, K.; Ikai, Y.; Mayumi, T.; Oka, H.; Suzuki, M.; Harada, K. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 3346–3352.

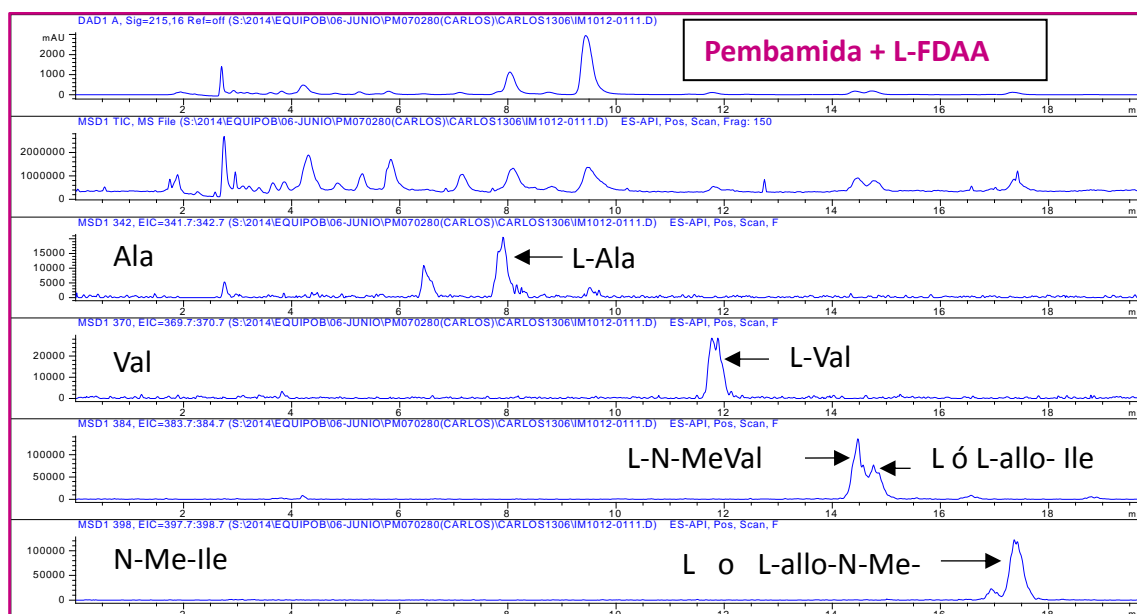


Figura 34. HPLC-MS y monitorización selectiva de los iones $[M+H]^+$ de relación m/z de los aminoácidos derivatizados con L-FDAA.

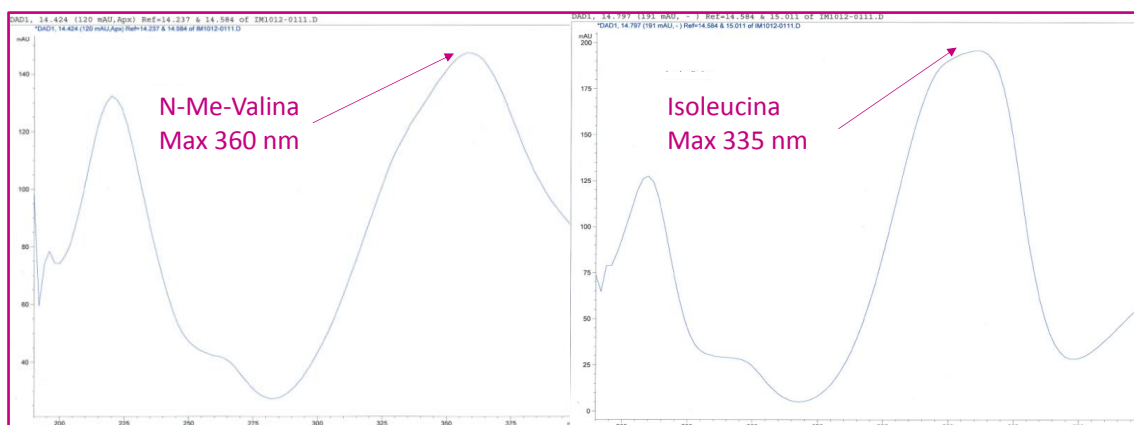


Figura 35. Espectros de UV de N-Me-Valina e Isoleucina derivatizados con L-FDAA.

A-Derivatización con L-FDAA y DFDA. De la misma forma, se analizaron los tiempos de retención de los aminoácidos derivatizados con L-FDAA y D-FDAA. En este caso se obtuvieron dos t_R : uno que corresponde a la configuración L y otro a la configuración D. Tal como se ha indicado anteriormente, el derivado con configuración L posee un t_R menor que el de configuración D, por lo que la comparación de los tiempos de retención obtenidos en el primer paso con los obtenidos en el segundo nos permite deducir la estereoquímica del aminoácido objeto de estudio.

En la derivatización de **1** con L-FDAA y D-FDAA, (Figura 36) se obtuvieron unos t_R para la alanina de 6.4 y 9.5 min. Teniendo en cuenta que el t_R obtenido en la derivatización de **1** con L-FDAA (6.4 min) coincide con el primer t_R obtenido con la derivatización de **1** usando la mezcla L-FDAA y D-FDAA, se concluyó que la configuración absoluta de la alanina debe ser L.

La determinación de la configuración absoluta del resto de los aminoácidos se realizó de la misma manera. Para la valina se obtuvieron los t_R de 11.9 y 15.5 min, siendo el t_R en el derivatizado con L-FDAA de 11.7 min, que corresponde con el t_R para la L-valina. Los t_R obtenidos para la *N*-MeVal fueron de 14.4 y 16.5 min que al compararlo con el t_R correspondiente con la L-FDAA (14.4 min), se deduce que el aminoácido posee una configuración L.

Como hemos dicho anteriormente, este análisis permite distinguir entre las configuraciones L y D de la isoleucina y la *N*-Metilisoleucina, pero no es posible distinguir entre la L y L-allo, ni entre la D y D-allo de ambos aminoácidos. Los t_R obtenidos para la isoleucina fueron 14.8 y 18.8 min, que al ser comparados con el t_R obtenido en el caso derivatizado con L-FDAA, se observó que coincide con el primero y por lo tanto debe poseer

la configuración L. Finalmente, los t_R para la *N*-Meisoleucina de 17.7 y de 19.9 min mostraron que el t_R obtenido con L-FDAA de 17.3 min coincide con el primero de ellos, indicando, como en los aminoácidos anteriores, que la *N*-Metilisoleucina presenta la configuración L.

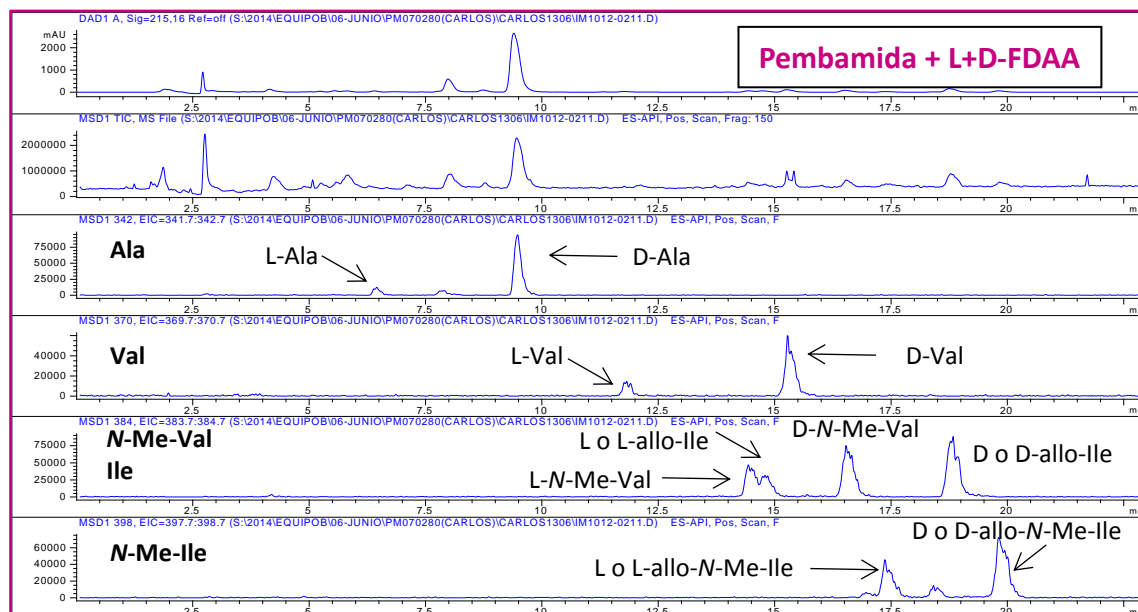


Figura 36. HPLC-MS y monitorización selectiva de los iones $[M+H]^+$ de relación m/z de los aminoácidos derivatizados con L-FDAA y D-FDAA.

Tabla 4. Monitorización selectiva de los iones de relación m/z de los aminoácidos derivatizados con L-FDAA y sus t_R , los aminoácidos derivatizados con L+D-FDAA y sus t_R y la configuración de los aminoácidos de pembamida (1).

	Monitorización selectiva ion de relación m/z	t_R aa derivatizado con L-FDAA	t_R aa derivatizado con L+D-FDAA	Configuración
Alanina	342	6.4	6.4 9.5	L
Valina	370	11.7	11.9 15.5	L
<i>N</i> -Me-Val	384	14.4	14.4 16.5	L
Isoleucina	384	14.7	14.8 18.8	L
<i>N</i> -Me-Ile	398	17.3	17.7 19.9	L
			L D	

Para determinar la configuración L ó L-allo de la isoleucina y la *N*-Metilisoleucina se aplicó el método de Marfey a estos aminoácidos y se compararon los t_R de los patrones estándar L y L-allo derivatizados con L-FDAA con el t_R obtenido al derivatizar los aminoácidos del hidrólisis de pembamida con L-FDAA.

Dado que son necesarios los patrones de las cuatro configuraciones, el empleo del método avanzado de Marfey permitió obtener dichos cuatro patrones. Para ambos aminoácidos se empleó el mismo método. A continuación, se detalla el procedimiento empleado para la *N*-Metilisoleucina. Al someter la *N*-Me-L-isoleucina a medio ácido se obtuvo la *N*-Me-D-allo-isoleucina mediante un proceso de racemización. El carbono en la posición α de la *N*-Me-L-isoleucina presenta una configuración S y, como consecuencia de la racemización, se obtiene la *N*-Me-D-allo-isoleucina cuyo carbono en posición α posee configuración R. De esta forma se obtuvieron las dos configuraciones L y D-allo de la *N*-metilisoleucina en una mezcla aproximada 1:1 (Figura 37).

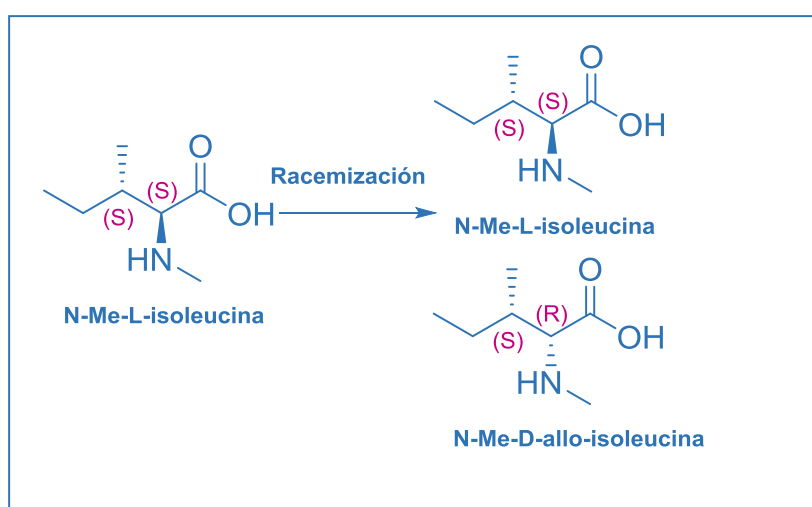


Figura 37. Racemización de (2S, 3S)-*N*-Me-L-isoleucina.

A los dos epímeros se aplicó el método avanzado de Marfey derivatizándolas con una mezcla 1:1 de L-FDAA y D-FDAA, obteniéndose los cuatro productos que son los mostrados en la parte superior de la Figura 38: L-FDAA-*N*-Me-L-iso, L-FDAA-*N*-Me-D-allo-iso, D-FDAA-*N*-Me-L-iso (equivale a L-FDAA-*N*-Me-D-iso) y D-FDAA-*N*-Me-D-allo-iso (equivale a L-FDAA-*N*-Me-L-allo-iso). Estos cuatro productos cuya estereoquímica se muestra debajo en la figura, representan las cuatro posibles configuraciones derivatizadas con L-FDAA (recuadrado en color fucsia), y fueron los patrones con los que se compararon los aminoácidos obtenidos de la hidrólisis de pembamida (**1**).

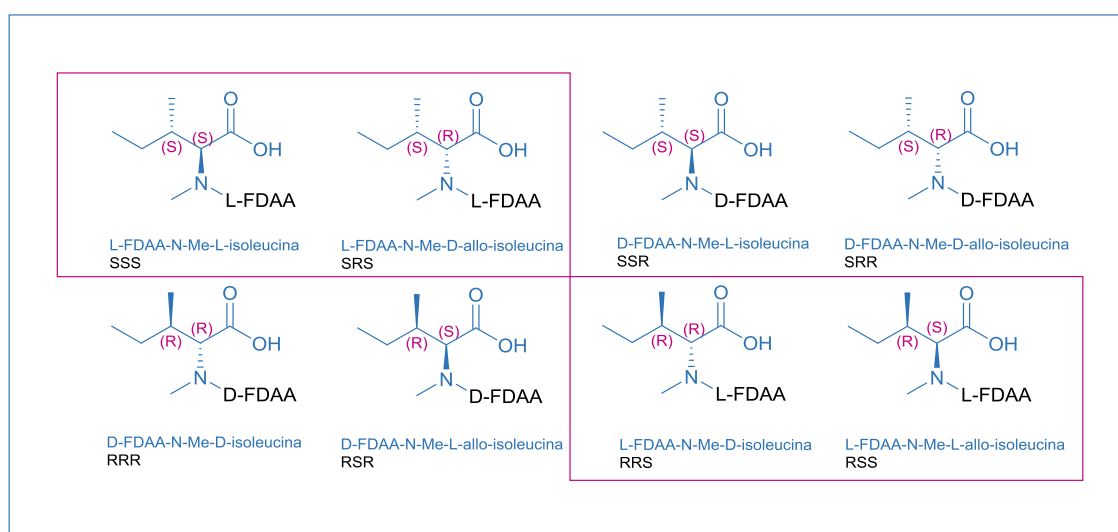


Figura 38. Posibles derivados isoméricos al aplicar el método avanzado de Marfey a una mezcla racémica de la *N*-Me-L-Isoleucina.

Mediante un método de separación por HPLC en el que sabemos el orden de elución de los cuatro patrones, analizamos la pembamida hidrolizada y derivatizada con L-FDAA y se comparan los t_R obtenidos (Figura 39).

En la figura 50B, la línea roja muestra el HPLC de los cuatro patrones de la *N*-Me-Isoleucina: L, L-allo, D-allo y D, con sus respectivos t_R de 26.6, 26.9, 29.8 y 30.1 min. En la figura 50A, la línea azul muestra el cromatograma de pembamida (**1**) hidrolizada y derivatizada con L-FDAA, en el que se puede observar un pico con un t_R de 26.6 min que coincide con el t_R del patrón de *N*-Me-L-Isoleucina, deduciéndose por tanto que la estereoquímica absoluta de dicho aminoácido se corresponde con la *N*-Me-Isoleucina.

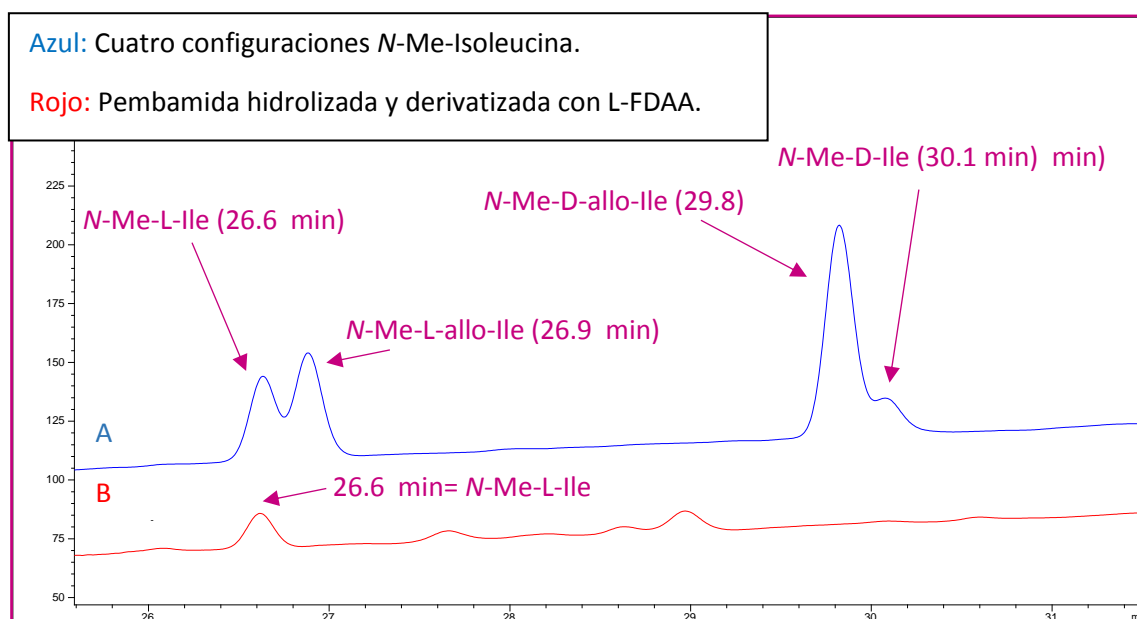


Figura 39. A: HPLC de los cuatro patrones de la *N*-Me-Isoleucina (L, L-allo, D y D-allo).
B: Cromatograma de HPLC de pembamida (**1**) hidrolizada y derivatizada con L-FDAA.

De la misma forma se determinó la configuración absoluta de la isoleucina. Las cuatro posibles configuraciones, L, L-allo, D y D-allo, son las mismas que en el caso de la *N*-Me-isoleucina (Figura 38) pero sin el grupo *N*-metilo.

En el caso de la isoleucina (Figura 40), los t_R obtenidos para los patrones son de 29.8 min para la L-isoleucina, 25.4 min para L-allo-isoleucina, 31.4 min para la D-isoleucina y de 38.4 min para la D-allo-Isoleucina. Dado que el t_R obtenido en el análisis de la pembamida (**1**) hidrolizada fue de 29.7

min, que se obtuvo por monitorización selectiva del ion de relación m/z 398 de la isoleucina derivatizada con L-FDAA, se dedujo que se trataba de L-isoleucina.

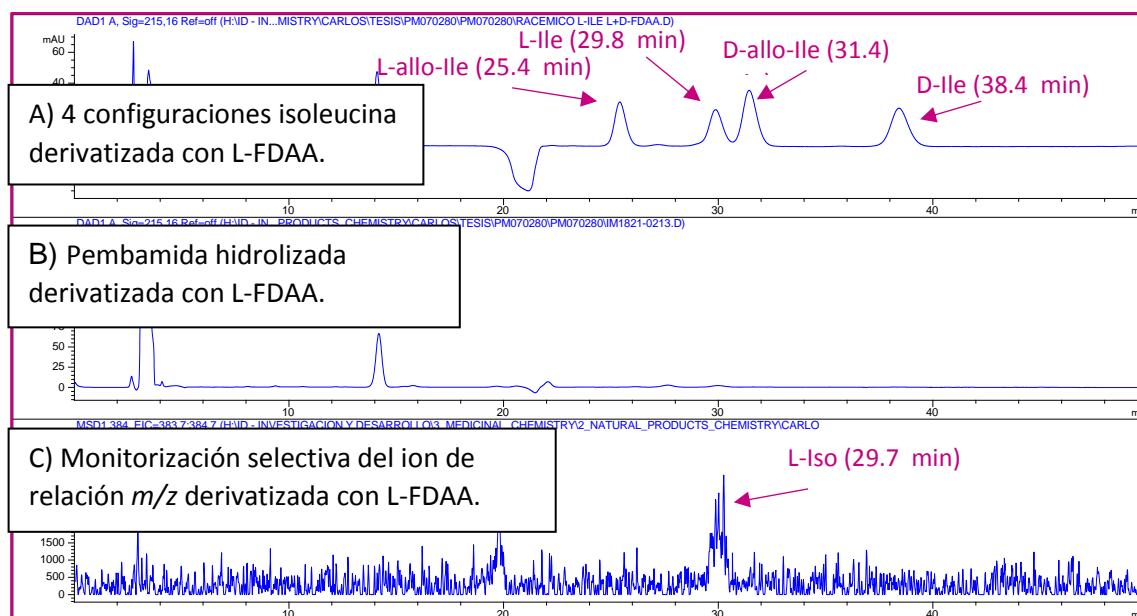


Figura 40. A) Cromatograma de HPLC de los cuatro patrones de la Isoleucina (L, L-allo, D y D-allo). B) Cromatograma de HPLC de pembamida (**1**) hidrolizada y derivatizada con L-FDAA,. C) Monitorización selectiva del ion de relación m/z 398 de la isoleucina derivatizada con L-FDAA.

Todos estos datos permitieron la determinación de la estereoquímica absoluta de pembamida (**1**) como la mostrada en la Figura 41, siendo L la configuración de todos los aminoácidos.

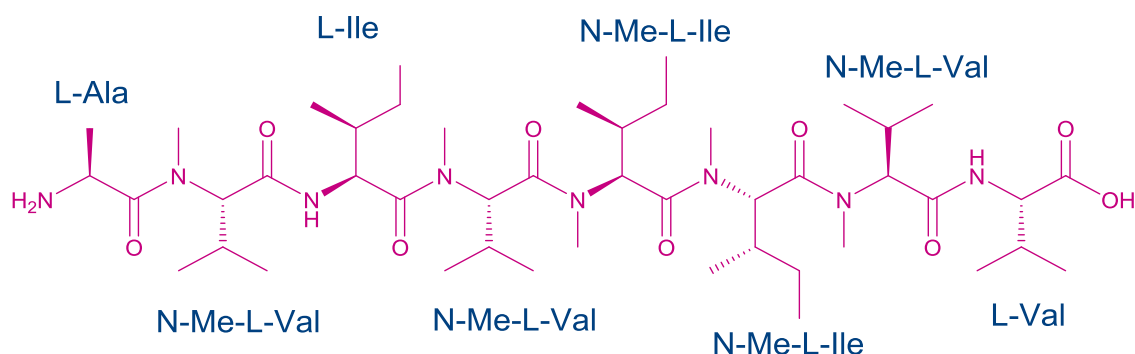


Figura 41. Estructura y estereoquímica absoluta de pembamida (1).

2.2.5 Actividad citotóxica de pembamida (1)

Pembamida presenta una actividad citotóxica moderada sobre células tumorales de mama, colon y pulmón con valores del orden micromolar (Tabla 5).

Tabla 5. Datos de la actividad citotóxica (μM) de la pembamida (1) y doxorubicin.

	Línea células tumorales		
	Mama	Colon	Pulmón
Pembamida	MDA-MB-231	HT-29	NSCLC A-549
GI ₅₀	3.3	3.8	2.4
TGI	8.1	3.9	> 112.0
LC ₅₀	>112	4.1	>112.0
Doxorubicin			
GI ₅₀	0.15	0.27	0.21
TGI	0.50	0.86	0.85
LC ₅₀	2.41	>17.2	>17.2

2.3 Conclusiones

El estudio de la esponja *Cribrochalina* sp. permite aislar e identificar un nuevo compuesto peptídico altamente *N*-metilado de origen marino que se denominó pembamida. Su estructura se dedujo mediante RMN, espectro de masas y la utilización del método avanzado de Marfey. El análisis farmacológico de este compuesto mostró que poseía una actividad citotóxica moderada sobre células tumorales. La alta presencia de grupos *N*-metilados supone una mejora en las propiedades fisicoquímicas que puede permitir su uso terapéutico como ocurre en el caso de otros péptidos lineales *N*-metilados aislados de organismos marinos. Este es el caso de los oxapéptidos RHM1 y RHM2,³⁶ cuyo verdadero origen puede ser de los microorganismos que se encuentran dentro de los marinos invertebrados. En nuestro caso, la fuente actual de pembamide está por determinar.

Los resultados de este estudio dieron lugar a la publicación: Pembamida, a Highly N-Methylated Linear Peptide from a Sponge *Cribrochalina* sp. Urda, C.; Pérez, M.; Rodríguez, J.; Jiménez, C.; Cuevas, C.; Fernández, R. *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57, 3239–3242.

³⁶a) Cane, D. E.; Walsh, C. T. *Chem. Biol.* **1999**, 6, R319–R325. b) Desriac, F.; Jégou, C.; Balnois, E.; Brillet, B.; Le Chevalier, P.; Fleury, Y. *Mar. Drugs* **2013**, 11, 3632–3660.



Capítulo 3: Estudio químico
de la esponja *Haliclona*
(*Reniera* sp.)

CAPITULO 3: ESTUDIO QUÍMICO DE LA ESPONJA *Haliclona* (*Reniera* sp.)

3.1 Antecedentes

Esta esponja pertenece al filo Porífera, clase Demospongiae, subclase Heteroscleromorpha, orden Haplosclerida y familia *Clalinidae*³⁷ y al subgénero *Reniera* que se encuadra dentro del género *Haliclona* (Figura 42).

Filo	Clase	Subclase	Orden	Familia	Género
<u>Porifera</u>	<i>Porifera incertae sedis</i> <u>Demospongiae</u> Hexactinellida Homoscleromorpha Calcarea	<u>Heteroscleromorpha</u> Keratosa Verongimorpha	Agelasida	<i>Calcifibrospongiidae</i> <i>Callyspongiidae</i> <u>Chalinidae</u> <i>Niphatidae</i> <i>Petrosiidae</i> <i>Phloeodictyidae</i>	<i>Chalinula</i> <i>Cladocroce</i> <i>Dendrectilla</i> <i>Dendroxea</i> <u>Haliclona</u>
			Axinellida		
			Biemnida		
			Bubarida		
			Clionaida		
			Polymastiida		
			<u>Haplosclerida</u>		
			Heteroscleromorpha		
			ha incertae sedis		
			Merliida		
			Poecilosclerida		
			Desmacellida		
			Scopalinida		
			Sphaerocladina		
			Trachycladida		
			Suberitida		
			Tethyida		
			Tetractinellida		
			Spongillida		

Figura 42. Clasificación taxonómica del género *Haliclona*.

Las esponjas de este género han sido ampliamente estudiadas a lo largo de estos últimos años, aislándose compuestos de diferente naturaleza química, algunos de los cuales presentan interesantes actividades biológicas.

³⁷ World Register of Marine Species (www.marinespecies.org)

Las primeras estructuras publicados de *Haliclona* (*Reniera* sp.) fueron las renieramicinas A-D³⁸ a por las Faulkner y Frincke en 1982, compuestos que se encuadran dentro de la familia de las tetrahidroquinoleínas.³⁹ Siete años después, Faulkner y He reportaron las renieramicinas E y F.⁴⁰ Las renieramicinas A-D presentan actividad antimicrobiana moderada.

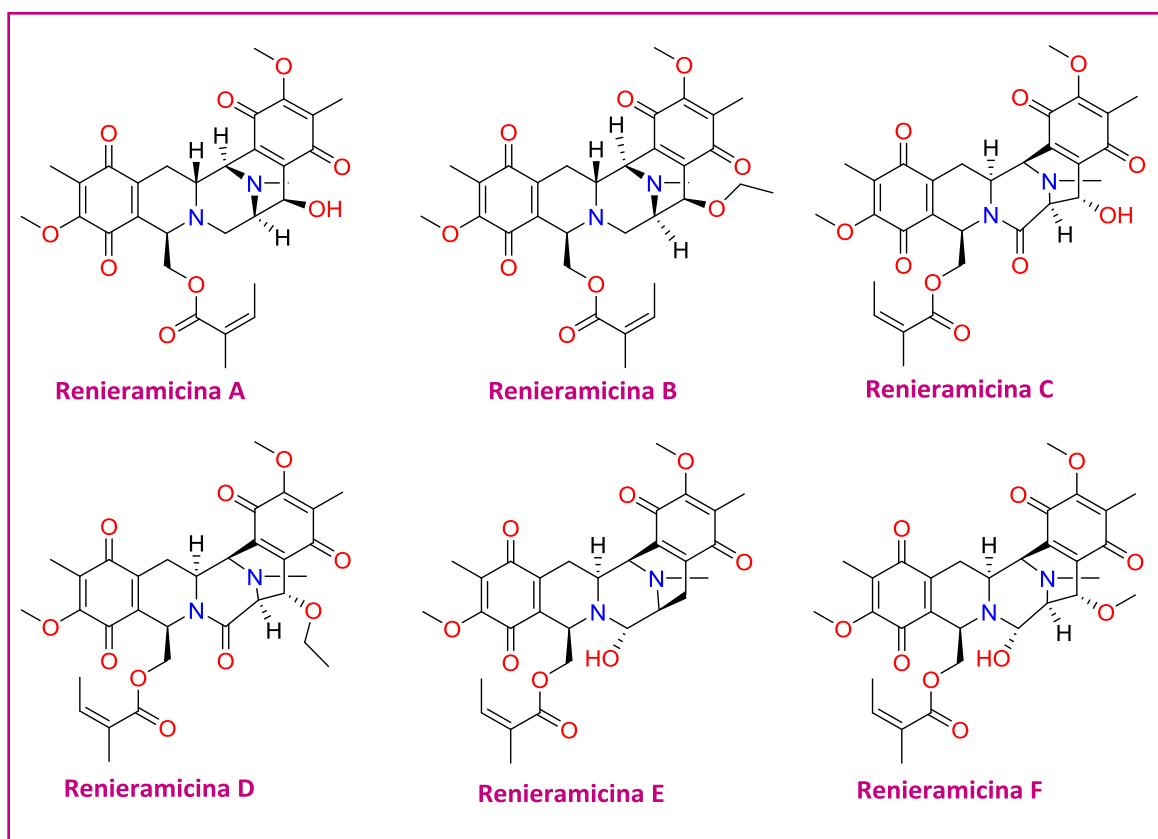


Figura 43. Estructuras de renieramicinas A-F aisladas de *Haliclona* (*Reniera* sp.).

Otro tipo de compuestos aislados de *Haliclona* (*Reniera* sp.) son los cerebrósidos. Su estructura consiste en el glucósido de una ceramida, a su vez formada por dos cadenas hidrocarbonadas, del tipo esfingosina y la otra un ácido graso. La unidad de azúcar se une a la ceramida a través del grupo hidroxilo que posee.

³⁸ Frincke, J. M.; Faulkner, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 265–269.

³⁹ Scott, J. D.; Williams, R. M. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1669–1730.

⁴⁰ He, H.; Faulkner, J. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5822–5824.

Entre los cerebrósidos aislados de *Haliclona* (*Reniera* sp.) se encuentran diez renierosidos A1-A5 y B1-B5 publicadas en 2007, que se diferencian en la longitud y sustituciones de la cadena⁴¹, pero no mostraron actividades citotóxicas frente a células tumorales humanas.

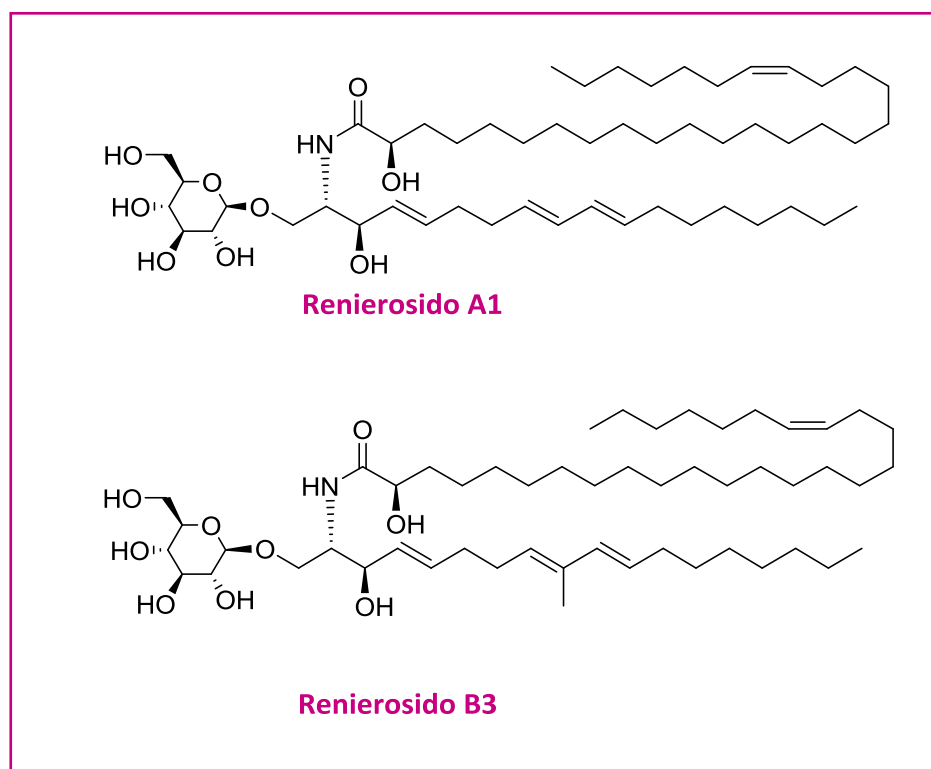


Figura 44. Estructuras de renierosido A1 y B3 aisladas de *Haliclona*

⁴¹ Mansoor, T. A.; Shinde, P. B.; Luo, X.; Hong, J.; Lee, C.; Sim, C. J.; Son, B. W.; Jung, J. H. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1481–1486.

Dos años más tarde, en 2009, se publicaron 14 nuevos renierósidos (C1-C14),⁴² de los cuales 9 contienen cadenas saturadas mientras los otros cinco poseen cadenas insaturadas.

El tercer tipo de compuestos aislados de este sub-género son las njaoaminas, que se caracterizan por la presencia de una unidad de 8-hidroxiquinoleína y de un núcleo tricíclico. Miembros de nuestro grupo de investigación de PharmaMar publicaron en 2006 las estructuras de las njaoaminas A-F⁴³, que se diferencian en la longitud, el número de dobles enlaces y los sustituyentes de la cadena carbonada. . En 2007 Kashman y col. reportaron el aislamiento de las njaoamines G y H⁴⁴ cuya diferencia principal con las anteriores es la presencia de un triple enlace en dichacadena. La actividad citotóxica de las njaoamines A–F fue evaluada frente a un panel de tres células tumorales humanas: colon, mama y pulmón. Todos estos compuestos presentaron actividad biológica con valores de rango micromolar.

⁴² Park, T.; Mansoor, T.A.; Shinde, P.B.; Bao, B.; Hong, J.; Jung, J. H. *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, *57*, 106–111.

⁴³ Reyes, F.; Fernández, R.; Urda, C.; Francesch, A.; Bueno, S.; de Eguilior, C.; Cuevas, C. *Tetrahedron*. **2007**, *63*, 2432–2438.

⁴⁴ Sorek, H.; Rudi, A.; Benayahu, Y.; Kashman, Y. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7691–7694.

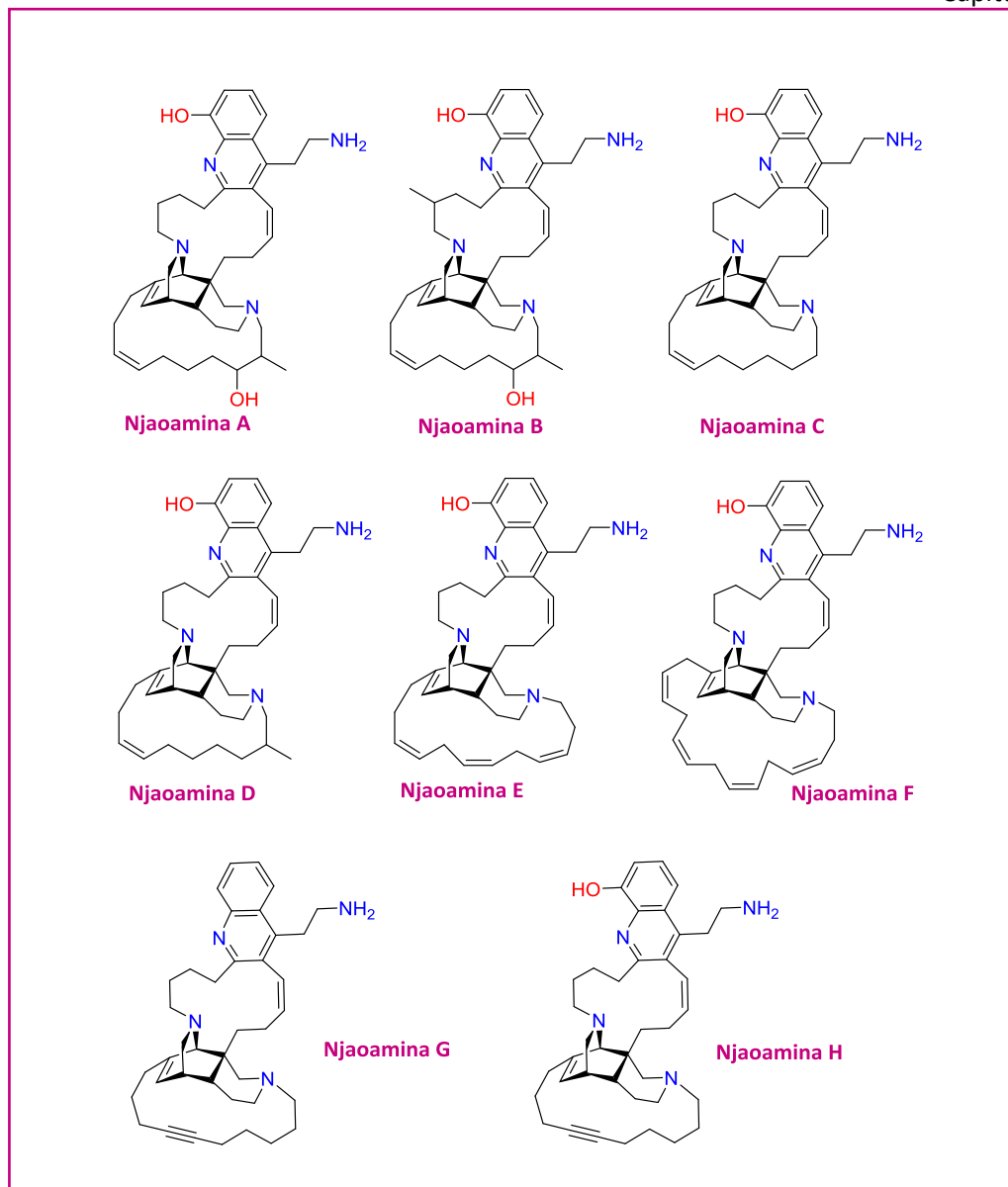


Figura 45. Estructuras de njaoaminas A-H aisladas de *Haliclona* (*Reniera* sp.).

Finalmente, otro tipo de compuestos aislados de *Haliclona* (*Reniera* sp.) y publicadas por nuestro grupo de investigación en 2009 fueron njaoaminiums A-C⁴⁵ que son sales de 3-alkilpidirinas cíclicas. Se diferencian entre sí por los diferentes sustituyentes que pueden presentar y se cree que son los precursores biosintéticos de las njaoamines, que fueron aisladas previamente de la misma esponja.

⁴⁵ Laville, R.; Genta-Jouve, G.; Urda, C.; Fernández, R.; Thomas, O. P.; Reyes, F.; Amade, P. *Molecules* **2009**, *14*, 4716–4724.

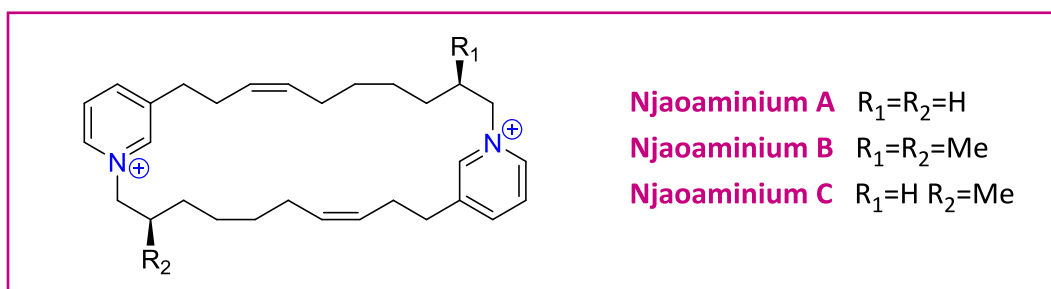


Figura 46. Estructuras de njaoaminiums A-C aisladas de *Haliclona* (*Reniera* sp.).

La actividad biológica de los tres compuestos fue evaluada frente a tipos distintos de células tumorales humanas y mostró que únicamente la njaoaminium B presenta actividad a concentraciones por debajo de 10 μM .

3.2 Resultados y discusión

3.2.1 Identificación y clasificación

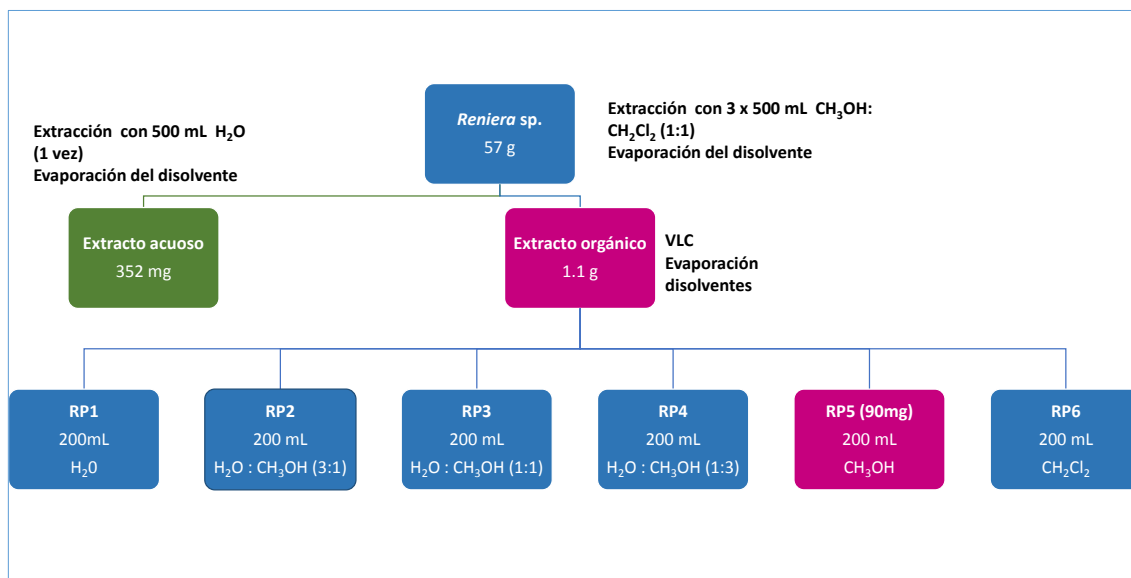
La esponja *Haliclona* (*Reniera*) sp. se recolectó a mano por el Departamento de Expediciones de PharmaMar en la Isla de Okuza situada al sur de Tanzania en octubre de 2007 (Figura 47), y se congeló inmediatamente. La identificación taxonómica de esta esponja fue realizada por el Dr. Jose Luis Carballo, almacenándose bajo el código ORMA50962



Figura 47. Fotografía de la esponja *Haliclona* (*Reniera* sp.) y localización de la región donde fue recolectada.

3.2.2 Extracción y fraccionamiento

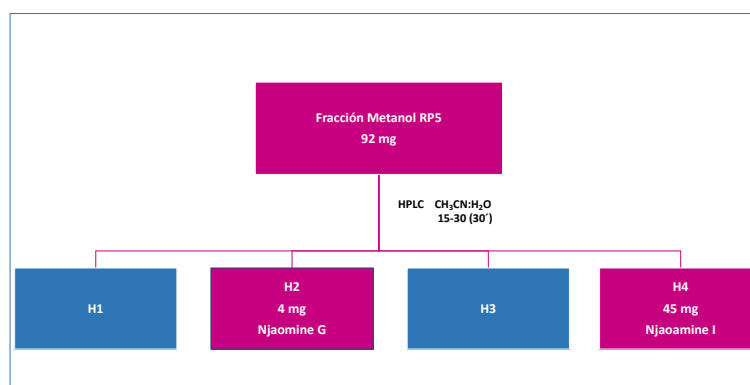
Con el fin de determinar los metabolitos secundarios responsables de la actividad, la esponja se trozeó y se extrajo tres veces con una mezcla de diclorometano:metanol (1:1) para a continuación realizar una extracción con agua. El extracto orgánico resultante se fraccionó mediante cromatografía flash a vacío en fase inversa, empleándose como fase móvil un gradiente de disolventes en orden decreciente de polaridad, obteniéndose seis fracciones (Esquema 3). Cada fracción se sometió a un ensayo *in vitro* frente a células tumorales, mostrando que la fracción eluída con metanol, denominada RP5, resultó ser la más activa.



Esquema 3. Fraccionamiento del extracto orgánico de la esponja *Haliclona* (*Reniera sp.*)

3.2.3 Aislamiento y purificación

La fracción activa RP5 se separó por HPLC obteniéndose 4 fracciones (Esquema 4). El bioensayo de las fracciones obtenidas mostró que las fracciones H2 y H4 presentaban actividad citotóxica. En la fracción H2 se detectó la njaoamine G en base a sus datos de masas, y posterior comparación con los datos publicados para este compuesto. El estudio en profundidad del compuesto puro obtenido de la fracción H4, finalizó con la identificación de una nueva estructura perteneciente a la familia de las njaoamines y que se denominó njaoamine I (2).



Esquema 4. Esquema de aislamiento de njaoamina I (2) de la fracción de metanol RP5.

3.2.4 Determinación de la estructura plana de njaoamine I (2)

La elucidación estructural de njaoamine I se llevó a cabo mediante la utilización de diversas técnicas espectroscópicas de RMN mono y bidimensionales y espectrometría de masas. El espectro de alta resolución (+)-HRES-TOFMS (Figura 48) muestra el ion con una m/z de 605.4586 $[M + H]^+$ que se corresponde con la fórmula molecular $C_{41}H_{56}N_4$ y la presencia de 16 grados de insaturación.

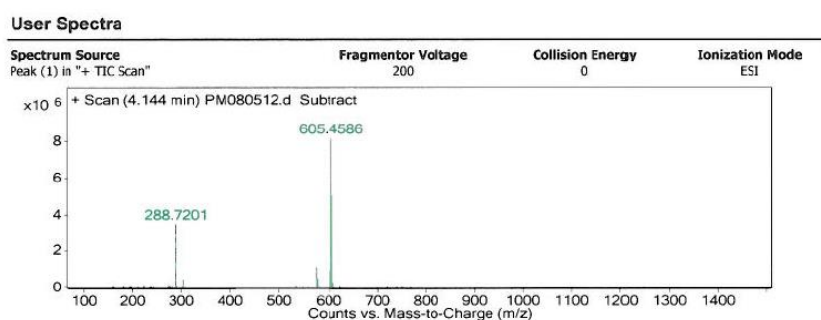


Figura 48. Espectro de masas de njaoamina I (2).

El análisis del espectro del RMN ^{13}C (Figura 49) reveló la presencia de 41 señales (Tabla 9) que junto a los datos aportados por los espectros del RMN 1H (Figura 50) y HSQC (Figura 51) se asignaron de la siguiente forma: 13 señales a campo bajo atribuibles a carbonos sp^2 característicos de carbonos olefínicos y grupos $C=N$, justificándose 7 grados de insaturación. Tres señales de carbonos sp^3 no protonados (δ 43.8, 80.6 y 81.5 ppm) y 25 señales que corresponden a carbonos sp^3 (tres grupos metinos, 22 grupos metilenos), de los cuales siete son carbonos nitrogenados.

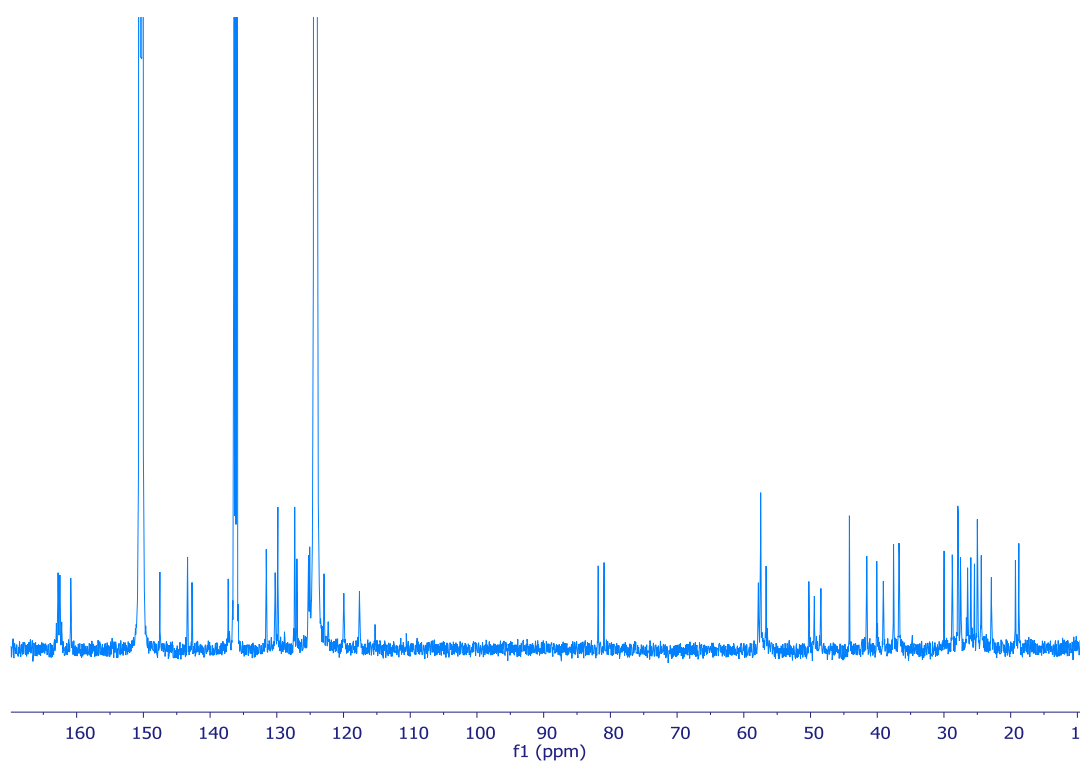


Figura 49. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de njaoamina I (**2**).

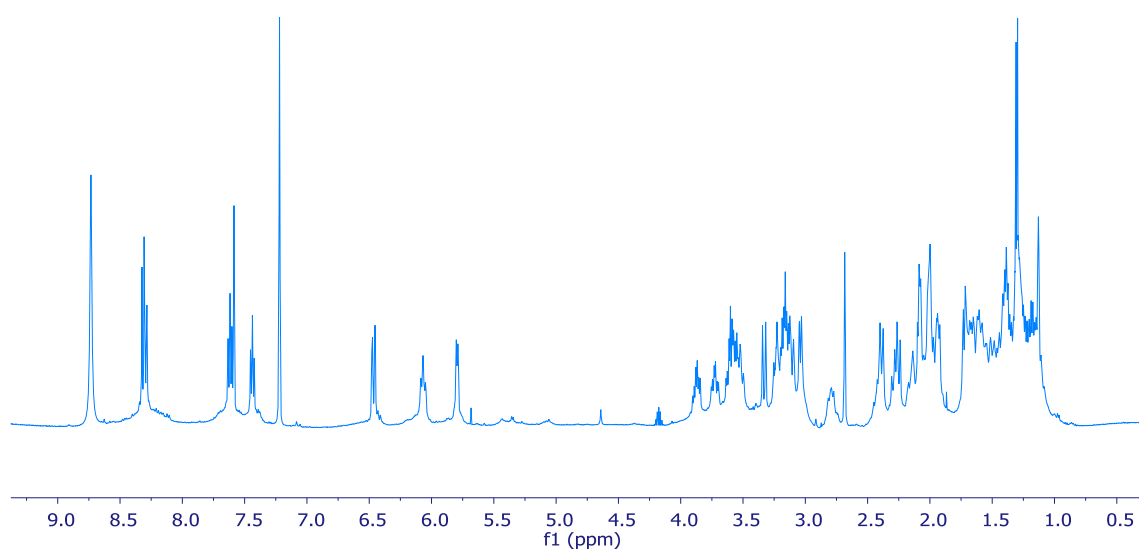


Figura 50. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de njaoamina I (**2**).

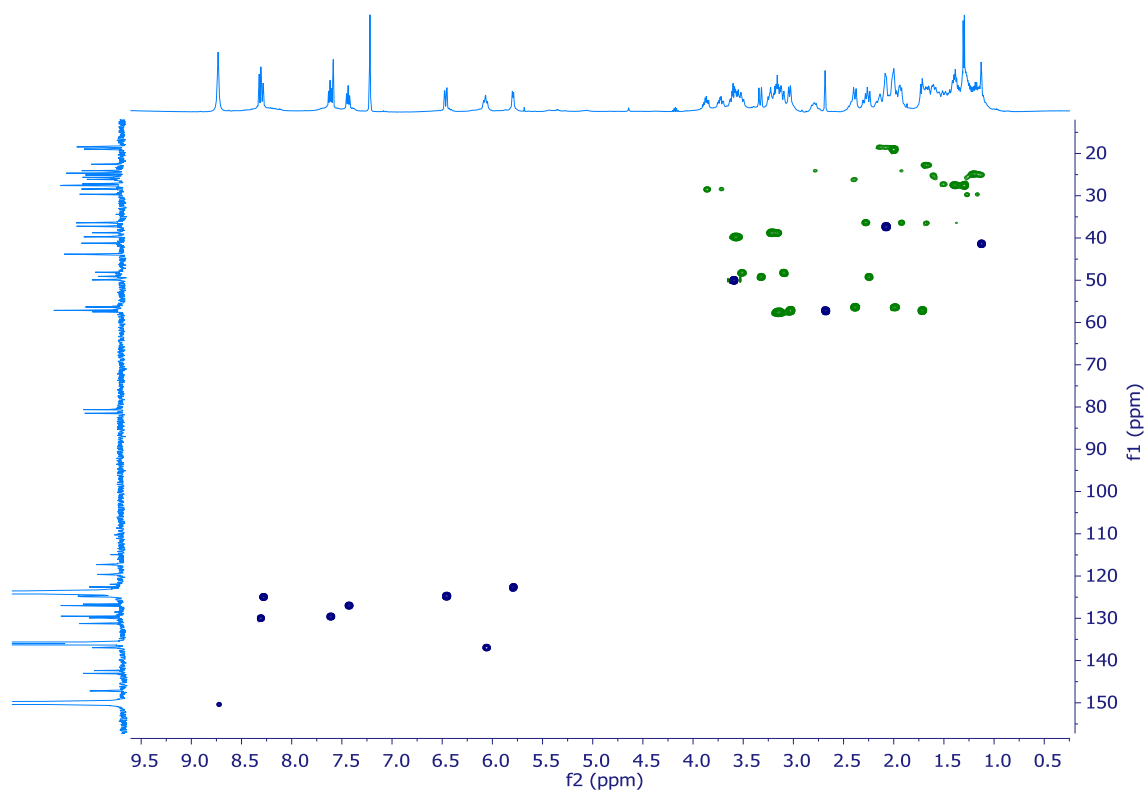


Figura 51. Espectro HSQC (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de njaoamina I (**2**). Señales de color azul corresponden a grupos metileno.

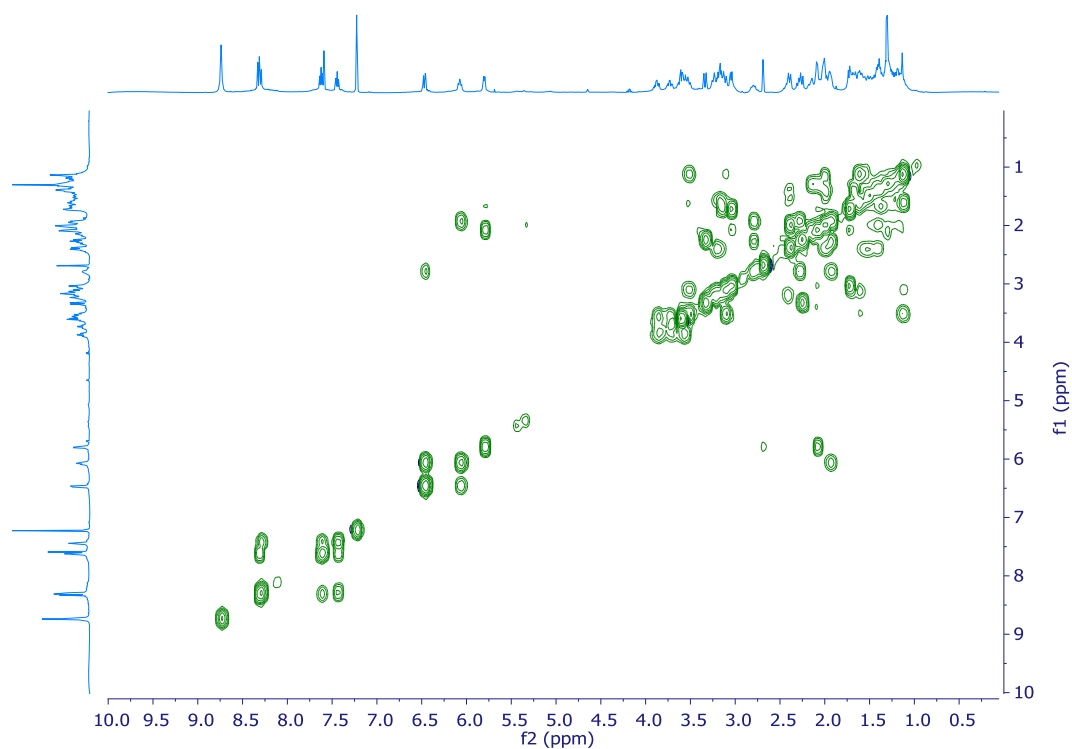
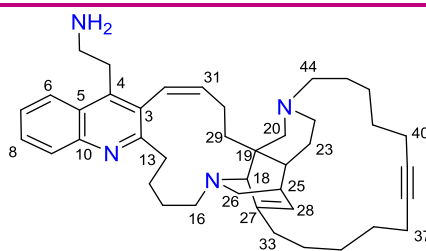


Figura 52. Espectro COSY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de njaoamina I (**2**).

Tabla 6. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de njaoamina I (**2**).

Pos.	d_{C} , mult.	d_{H} , mult., J in Hz	Pos.	d_{C} , mult.	d_{H} , mult., J in Hz
N1			23	25.1, CH ₂	1.13, m; 1.60, m
2	160.5, C		24	41.2, CH	1.12, m
3	131.2, C		25	37.2, CH	2.05, m
4	142.4, C		26	57.1, CH ₂	1.72, m; 3.04, m
5	126.6, C		27	143	
6	124.9, CH	8.25, d (8.5)	28	122.6, CH	5.80, d (6.4)
7	127.0, CH	7.42, t (7.6)	29	36.3, CH ₂	1.92, m; 2.28, m
8	129.5, CH	7.59, t (7.6)	30	24.1, CH ₂	1.93, m; 2.78, m
9	129.9, CH	8.28, d (8.5)	31	136.9, CH	6.07, m
10	147.2, C		32	124.7, CH	6.45, d (10.4)
11	28.4, CH ₂	3.68, m; 3.83, m	33	36.4, CH ₂	1.38, m; 1.68, m
12	39.7, CH	3.55, m	34	25.6, CH ₂	1.27, m; 1.45, m
13	38.7, CH ₂	3.15, m; 3.22, m	35	24.6, CH ₂	1.21, m
14	26.1, CH ₂	1.57, m; 2.40, m	36	27.6 CH ₂	1.30, m
15	27.5, CH ₂	1.39, m	37	18.4, CH ₂	2.08, m; 2.14, m
16	56.3, CH ₂	1.99, m; 2.39, m	38	80.6, C	
N17			39	81.5, C	
18	57.1, CH	2.65, m	40	18.9, CH ₂	2.00, m
19	43.8, C		41	29.7, CH ₂	1.17, m; 1.27, m
20	49.1, CH ₂	3.32, m; 2.25, m	42	25.2, CH ₂	1.26, m; 1.41, m
N21			43	22.5, CH ₂	1.69, m
22	48.1, CH ₂	3.50, m; 3.10, m	44	57.5, CH ₂	3.16, m

**Njaoamina I**

Un análisis más exhaustivo de los experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, HSQC-TOCSY y editado-HSQC, permitió distinguir tres subestructuras principales A, B y C.

La presencia en el espectro de RMN ^1H de los protones a δ_{H} 8.25, 7.42, 7.59, 8.28 ppm (H-6, H-7, H-8 y H-9, respectivamente), asignados a cuatro protones aromáticos adyacentes, junto con las correlaciones a larga distancia observadas en el HMBC (Figura 53) entre estos protones y sus carbonos cuaternarios vecinos C-4, C-5 y C-6, indican la presencia de una subestructura A que corresponde a una 2,3,4-quinoleína trisustituída.

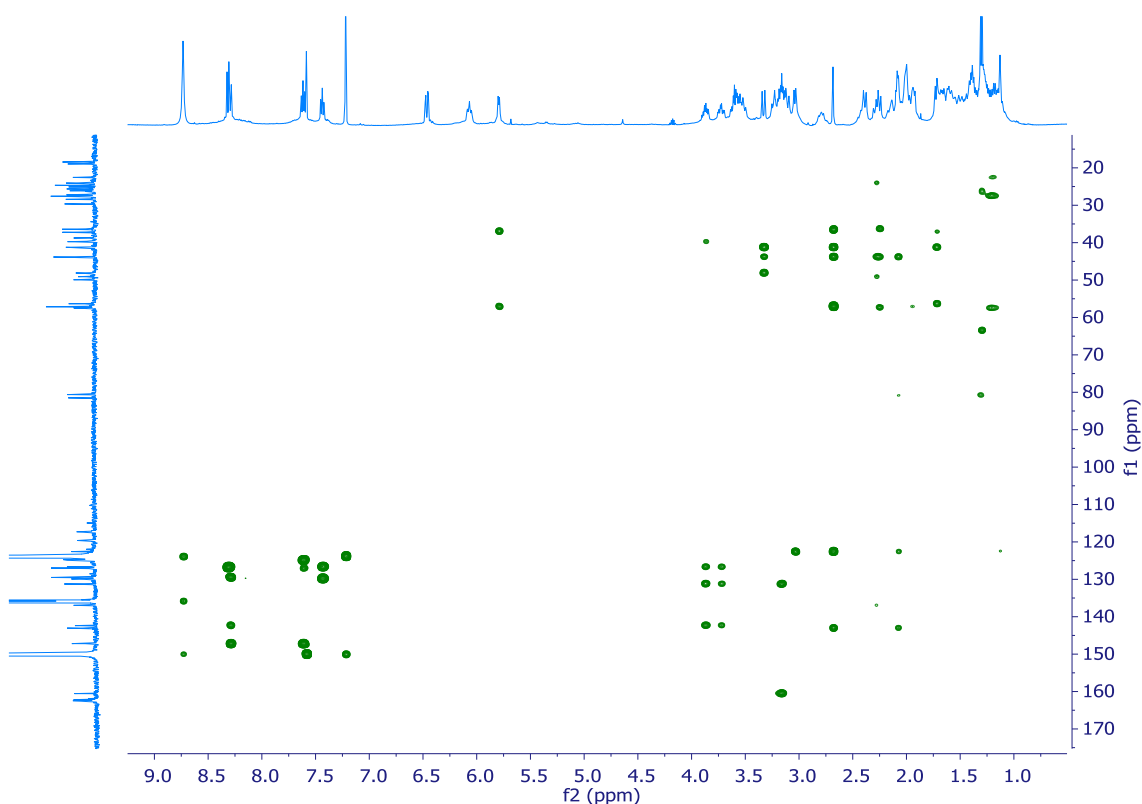


Figura 53. Espectro HMBC (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de njaoamine I (**2**).

El sustituyente en la posición C-4 se identificó como un grupo 2-aminoetil a partir de las correlaciones COSY observadas entre los grupos metileno H-11 (δ_{H} 3.68, 3.83) y H-12 (δ_{H} 3.55), sus correspondientes desplazamientos de carbono C-11 (δ_{C} 28.4) y C-12 (δ_{C} 39.7) y las correlaciones observadas

en el experimento HMBC entre dichos protones con C-4 (δ_C 142.4). Además, los sustituyentes en las posiciones C-2 y C-3 de la quinoleína se asignó a dos sistemas de espín deducidos a partir de los experimentos COSY y HMBC. Un primer sistema de espín se asignó a un doble enlace disustituído (Δ^{31}) unido a una cadena constituida por dos grupos metilenos H-29 (δ_H 1.92, 2.28) y H-30 (δ_H 1.93, 2.78). La correlación observada en el experimento HMBC entre los protones H-31 (δ_H 6.07) y H-32 (δ_H 6.45) con el carbono C-3 (δ_C 131.2) permitió unir este sistema de espín al anillo de quinoleína por la posición C-3. Un segundo sistema de espín formado por una cadena de cuatro grupos metileno, desde C-13 a C-16, que se unió al anillo de quinoleína por la posición C-2 a partir de la correlación observada en el experimento HMBC entre el protón H-13 (δ_H 3.15, 3.22) y el carbono C-2 (δ_C 160.5). (Figura 54).

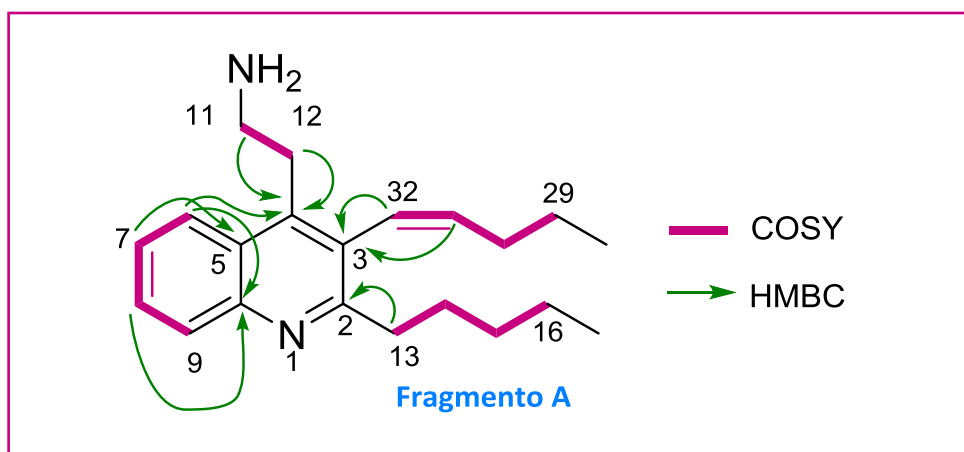


Figura 54. Sistema de spin y correlaciones a larga distancia (HMBC) observados en el fragmento A.

Una búsqueda por subestructura de este fragmento A en las bases de datos MarinLit y Scifinder, dio como resultado njoamina G que se detectó en el análisis de HPLC/MS del extracto de metanol RP5. La comparación de los datos de RMN de **3** con los reportados para la njoamina G confirmaron

no sólo la existencia del mismo fragmento A, sino también la presencia de la subestructura B que se caracteriza por la existencia de un núcleo tricíclico que contiene dos átomos de nitrógeno. La estructura de este fragmento B se corroboró mediante correlaciones observadas en el COSY (H-22-H-23, H-23-H-24, H-24-H-25, H-25-H-26 y H-25-H-28) y las correlaciones a larga distancia observadas en el HMBC entre H-18 (δ_H 2.69) con C-19 (δ_C 43.8), C-24 (δ_C 41.2), C-26 (δ_C 57.1), C-27 (δ_C 143.0) y C-28 (δ_C 122.6), junto con las de H-25 (δ_H 2.05) con C-27 (δ_C 143.0) y C-19 (δ_C 43.8) y H-20 (δ_H 2.25, 3.32) con C-19 (δ_C 43.8) (Figura 55).

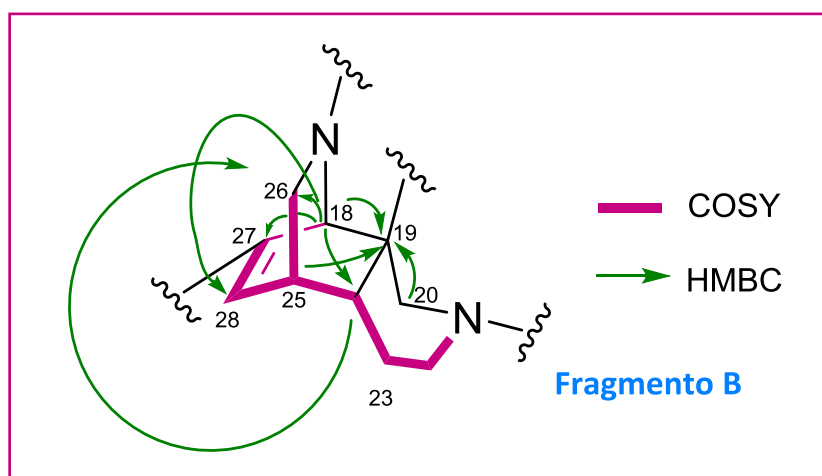


Figura 55. Sistema de spin y correlaciones a larga distancia (HMBC) observados en el fragmento B.

El resto de señales dio lugar a la subestructura C que consiste en una cadena de 12 carbonos (C-33 a C-44) que contiene 10 grupos metilenos y 2 carbonos de triple enlace, que difiere de los compuestos conocidos de la familia de las njoaminas. La dificultad para interpretar dicha cadena por RMN, debido a la superposición de señales en la zona comprendida entre 1.17 y 2.00 ppm, hizo que se tuviera que realizar el experimento de RMN HSQC-TOCSY (Figura 55).

Las correlaciones COSY observadas entre H-33 (δ_{H} 1.38, 1.68) y H-34 (δ_{H} 1.27, 1.45) y entre H-36 (δ_{H} 1.30) y H-37 (δ_{H} 2.14, 2.08), combinado con las correlaciones observadas en el experimento HSQC-TOCSY entre C-40 (δ_{C} 18.9) hasta C-44 (δ_{C} 57.5), estableció inequívocamente la posición del triple enlace en el centro de la cadena 6-dodecenino. Además, las correlaciones a larga distancia en el experimento HMBC entre H-37 (δ_{H} 2.08, 2.14) y el carbono C-38 (δ_{C} 80.6), y entre H-40 (δ_{H} 2.0) y el carbono C-39 (δ_{C} 81.5), localizó en la cadena a cada uno de los dos carbonos del triple enlace (Figura 58).

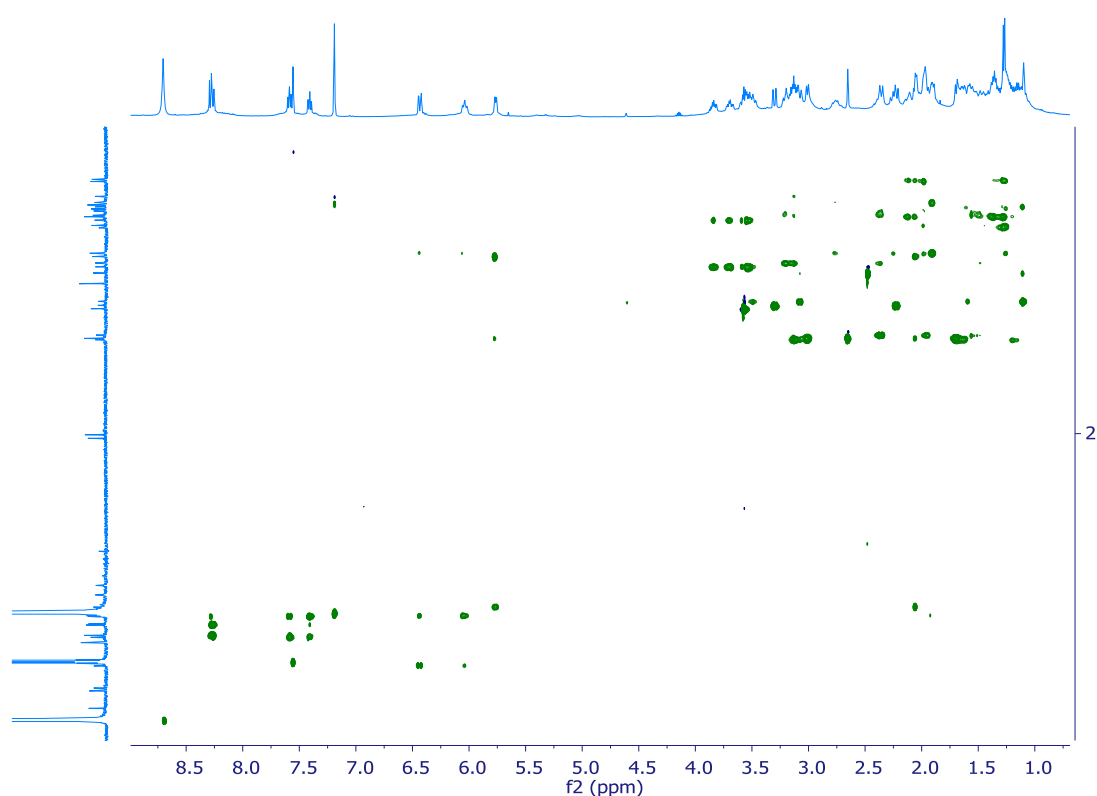


Figura 56. Espectro HSQC-TOCSY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de njaoamina I (**2**).

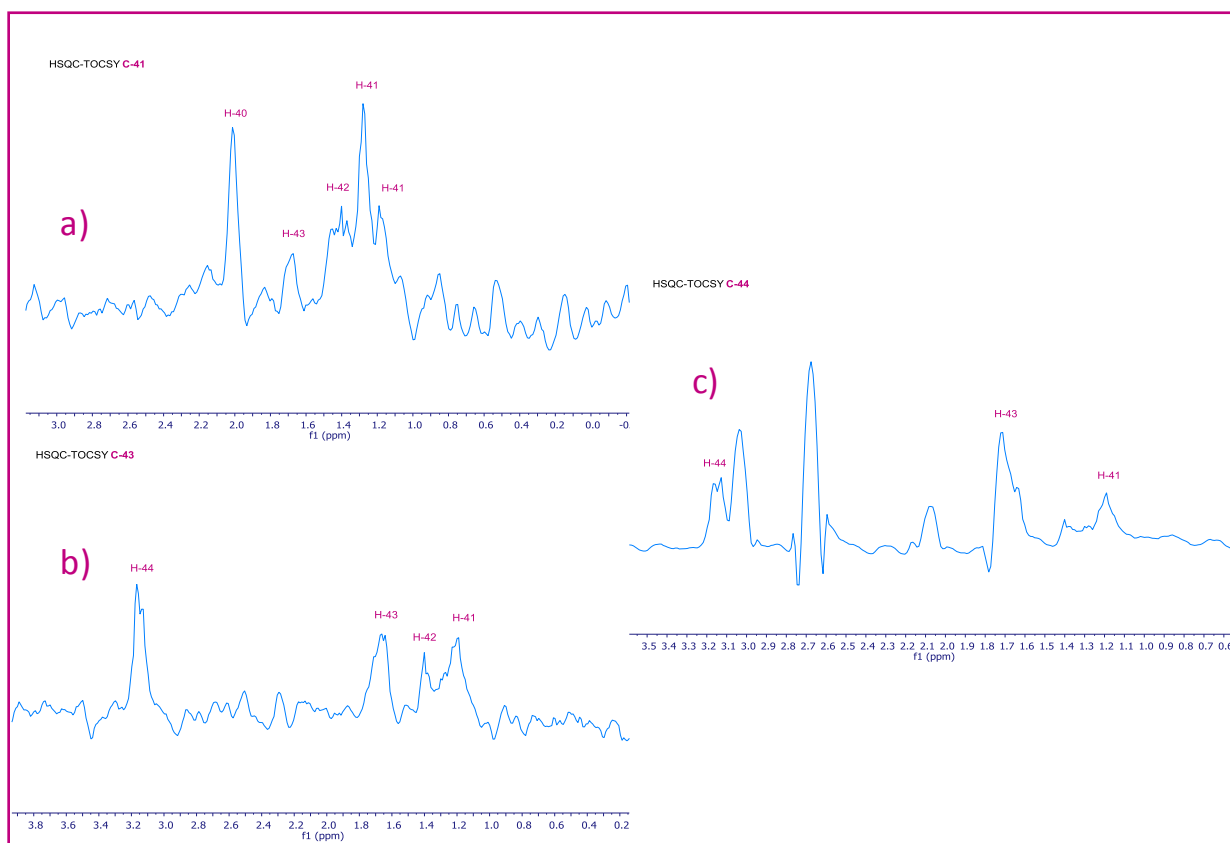


Figura 57. a) Proyección del espectro de protón a δ_c 29.7 del experimento HSQC-TOCSY. b) Proyección del espectro de protón a δ_c 22.5 del experimento HSQC-TOCSY. c) Proyección del espectro de protón a δ_c 57.5 del experimento HSQC-TOCSY

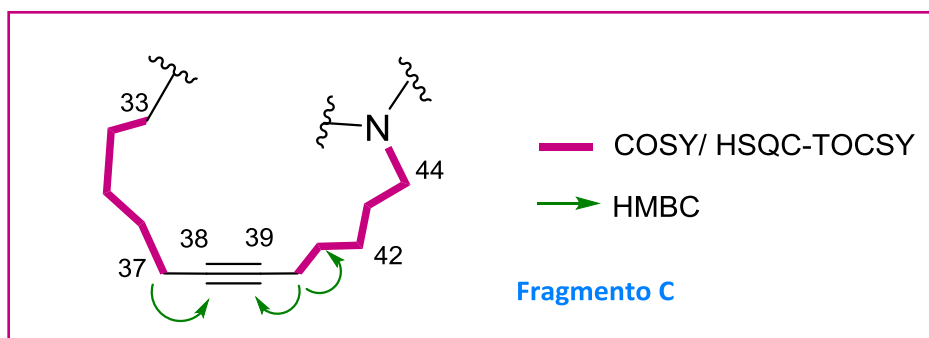


Figura 58. Sistema de spin y correlaciones a larga distancia (HMBC) observados en el fragmento C.

Finalmente, la conexión de las tres subestructuras, la 2,3,4-quinoleína trisustituída (A), el núcleo tricíclico (B) y la cadena dodecenine (C), se estableció mediante el análisis de las correlaciones a larga distancia observadas en el HMBC (Figura 59). Los fragmentos A y B se conectaron

entre sí mediante las correlaciones a larga distancia entre H-16 (δ_H 1.99, 2.39) y C-18 (δ_C 57.1) y entre H-29 (δ_H 1.92, 2.28) y C-19 (δ_C 43.8). Por último, el fragmento C se conectó al fragmento B mediante las correlaciones observadas en el experimento HMBC, entre H-20 (δ_H 2.25, 3.32) y C-44 (δ_C 57.5) y entre H-33 (δ_H 1.38, 1.68) y C-27 (δ_C 143.0). De esta forma se dedujo la estructura de la njaoamina I (**2**) como la mostrada en la Figura 59.

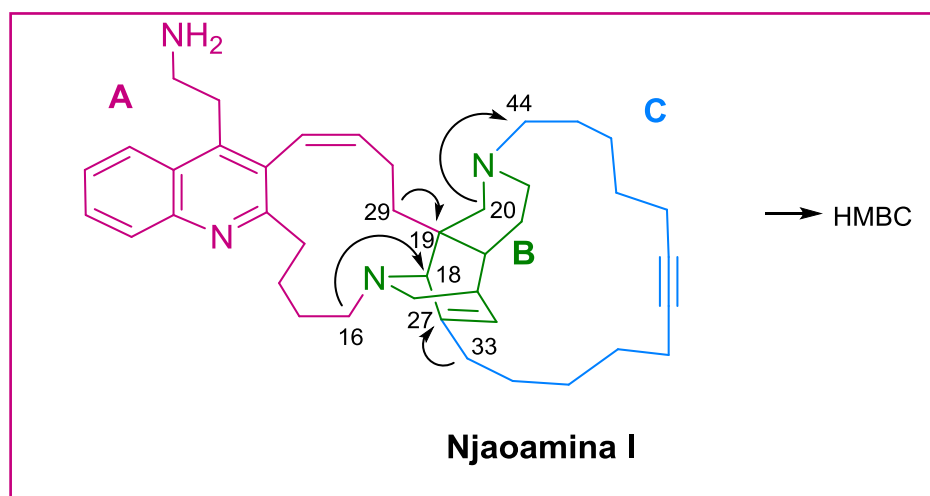


Figura 59. Conexión de los fragmentos A-E mediante las correlaciones observadas de njaoamina I (**2**) en el experimento HMBC.

3.2.5 Actividad citotóxica de njaoamine I (2)

Njaoamine I presenta unos valores de actividad citotóxica sobre células tumorales de mama, colon y pulmón (Tabla 10) del orden micromolar que son similares a los presentados por otros integrantes de la familia (Tabla 8).

Tabla 7. Datos de la actividad citotóxica (μM) de njaoamine (2) y doxorubicin.

Njaoamine I	Línea células tumorales		
	Mama MDA-MB-231	Colon HT-29	Pulmón NSCLC A-549
GI ₅₀	3.0	1.4	2.6
TGI	3.1	2.6	2.8
LC ₅₀	3.3	4.5	3.0
Doxorubicin			
GI ₅₀	0.15	0.27	0.21
TGI	0.50	0.86	0.85
LC ₅₀	2.41	>17.2	>17.2

Tabla 8. Datos actividad GI₅₀ (μM) de njaoamines A-F.

Compuesto	Línea células tumorales		
	Mama MDA-MB-231	Colon HT-29	Pulmón NSCLC A-549
Njaoamine A	6.6	6.7	6.7
Njaoamine B	1.5	2.2	1.5
Njaoamine C	5.2	6.4	6.6
Njaoamine D	7.2	6.7	7.2
Njaoamine E	2.8	3.7	3.0
Njaoamine F	6.7	6.1	5.7

3.3 Conclusiones

El estudio de la esponja Haliclona (*Reniera* sp.) permitió aislar e identificar un nuevo integrante de la familia de las njaoamines que se denominó njaoamine I. La principal diferencia con respecto a njaoamine G es un metileno adicional en la cadena carbonada que contiene el triple enlace. El análisis farmacológico de este compuesto mostró que poseía una actividad citotóxica moderada frente a un panel de tres células tumorales.



Capítulo 4: Estudio químico
del coral blando
Protodendron repens.

CAPITULO 4: ESTUDIO QUÍMICO DEL CORAL BLANDO *Protodendron repens*.

4.1 Antecedentes

Protodendron repens es un coral blando perteneciente al filo Cnidaria, clase Anthozoa, subclase Octocorallia, orden Alcyoniina y familia Alcyoniidae.⁴⁶ Su clasificación taxonómica de la especie se presenta en la figura 70.

Filo	Clase	Subclase	Orden	Suborden	Familia	Género	Especie
Cnidaria	Anthozoa Cnidaria Cubozoa Hydrozoa Myxozoa Scyphozoa Staurozoa	Ceriantharia Hexacorallia Octocorallia	Alcyonacea Helioporacea Octocorallia Pennatulacea	Alcyoniina Calcaxonina Holaxonia Protoalcyonaria Scleraxonia Stolonifera	Alcyoniidae Aquaumbridae Nephtheidae Nidaliidae Paralcyoniidae Xeniidae	Acrophytum Alcyonium Aldersladum Anthomastus Bathyalcyon Bellonella Cladiella Complexum Dampia DimorphophytonDiscophyton Elbeenus Eleutherobia Heteropolypus Inflatocalyx Klyxum Lampophyton Lanthanocephalus Lithophyton Lobophytum Lobularia Lohowia Malacacanthus Minabea Notodysiferus Paraminabea Parerythropodium Protodendron Pseudoanthomastus Rhytisma Sarcophyton Sinularia Skamnarium Sphaeralcyon Sphaerasclera Thrombophyton Verseveldtia	<i>Protodendron bruuni</i> <i>Protodendron repens</i> <i>Protodendron verseveldti</i>

Figura 60. Clasificación taxonómica de la especie *Protodendron repens*.

⁴⁶ World Register of Marine Species (www.marinespecies.org)

Los metabolitos secundarios más comunes aislados de corales blandos son los diterpenos. Dentro de estos, se encuentran los compuestos tipo xenicano⁴⁷ que se caracterizan por presentar dos anillos fusionados, uno de los cuales está formado por nueve carbonos.

Dependiendo de la naturaleza del otro anillo, los xenicanos se clasifican en cuatro familias: xenicinas, xeniolidos, xeniaphyllanas y xeniaéteres:

Xenicinas: anillo de 11-oxabicyclo [7.4.0]tridecano con un grupo acetal.

Xeniolidos: anillo de 11-oxabicyclo [7.4.0]tridecano con un grupo lactona.

Xeniaphyllanos: anillo de bicyclo [7.2.0]undecano.

Xeniaéteres: anillo de 11-oxabi-ciclo [7.3.0]dodecano.

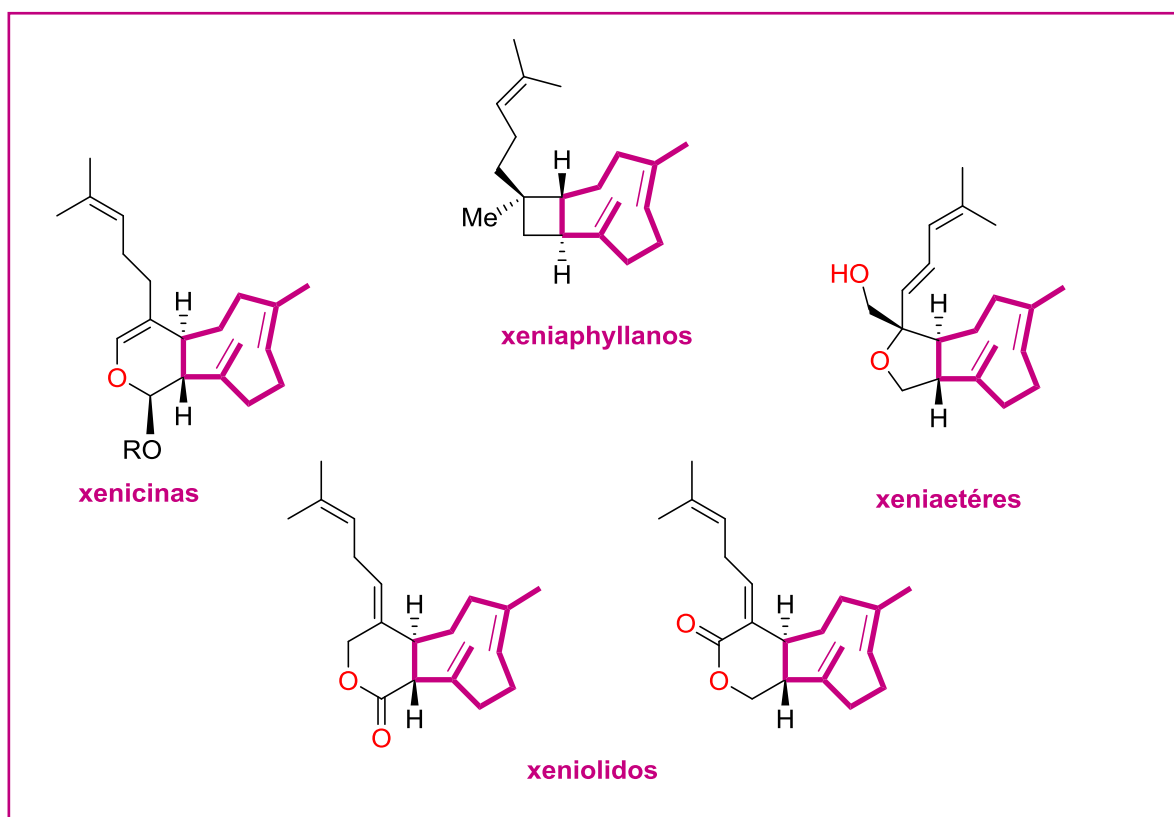


Figura 61. Tipos estructurales de la familia de xenicanos.

⁴⁷ Huber, T.; Weisheit, L.; Magauer, T. *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 2521–2539.

Los xenicanos han sido aislados únicamente de organismos marinos, concretamente de corales blandos del género *Xenia* y *Acanthogorgia* y de algas pardas del género *Dictyota*.

Desde la primera publicación hace 40 años de xenicina,⁴⁸ se han reportado más de 100 compuestos tipo xenicano.

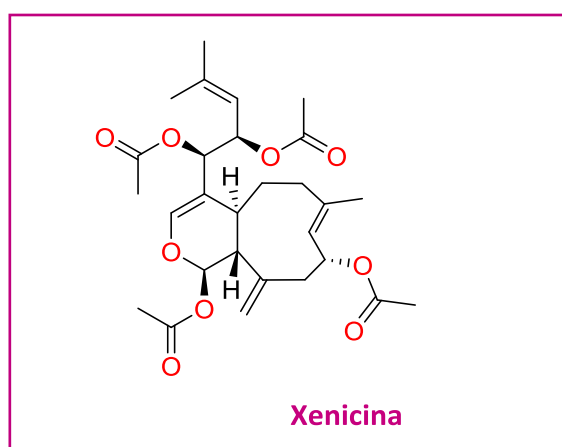


Figura 62. Estructura de xenicina aislada de *Xenia elongata*.

Desafortunadamente, los trabajos descritos sobre el aislamiento y elucidación estructural de muchos de los xenicanos aislados en los años 70 y 80 no vienen acompañados por los datos de sus actividades biológicas. Por el contrario, en los últimos años, el aislamiento de nuevos compuestos de este tipo ya vienen acompañados de estudios de sus actividades biológicas. A continuación, se presentan distintos xenicanos indicando sus actividades biológicas en función de su tipo de estructura.⁴⁹

⁴⁸ Steudler, P. A.; Ciereszko, L. S.; Ekstrand, D.; Helm, V. Der. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 5780–5784.

⁴⁹ Betschart, L.; Altmann, K.-H. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, 21, 5467–5488.

De las xenicinas destaca ginamalleno,⁵⁰ reportada en 1988, que presenta actividad sobre la inhibición al crecimiento de células de leucemia de ratón con un valor IC_{50} de 0.27 $\mu\text{g/mL}$.

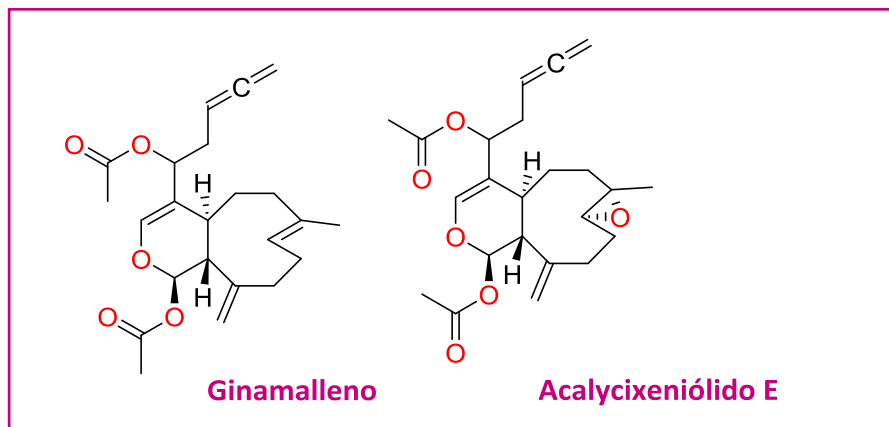


Figura 63. Estructuras de ginamalleno y acalycixeniólido E aisladas del género *Acalycigorgia*.

Acalycixeniólido B,^{51,52} estructuralmente relacionada con ginamalleno, presenta actividad citotóxica contra células de leucemia con un valor LC_{50} de 4.7 $\mu\text{g/mL}$, destacando que además presenta actividad antiangiogénica.

Aunque no se dispone de los datos de actividad de las helioxenicinas,⁵³ se muestran sus estructuras debido a su similitud con los compuestos aislados en este capítulo. Fueron aisladas del coral azul *Heliopora coerulea*. y publicadas en 1994 por Tanaka y col.

⁵⁰ S. Hokama, J. Tanaka, T. Higa, N. Fusetani, M. Asano, S. Matsunaga, K. Hashimoto *Chem. Lett.*, **1988**, 855-856

⁵¹ Rho J-R, Oh M-S, Jang KH, Cho KW, Shin J. *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 540-543

⁵² Kwon HJ, Kim JH, Jung JH, et al. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, 11, 656-62.

⁵³ Tanaka, J.; Ogawa, N.; Liang, J.; Higa, T.; deNys, R.; Bowden, B. F.; Carroll, A. R.; Coil, J. C.; Bernardinelli, G.; Jefford, C. W. *Tetrahedron* **1994**, 50, 9989–9996.

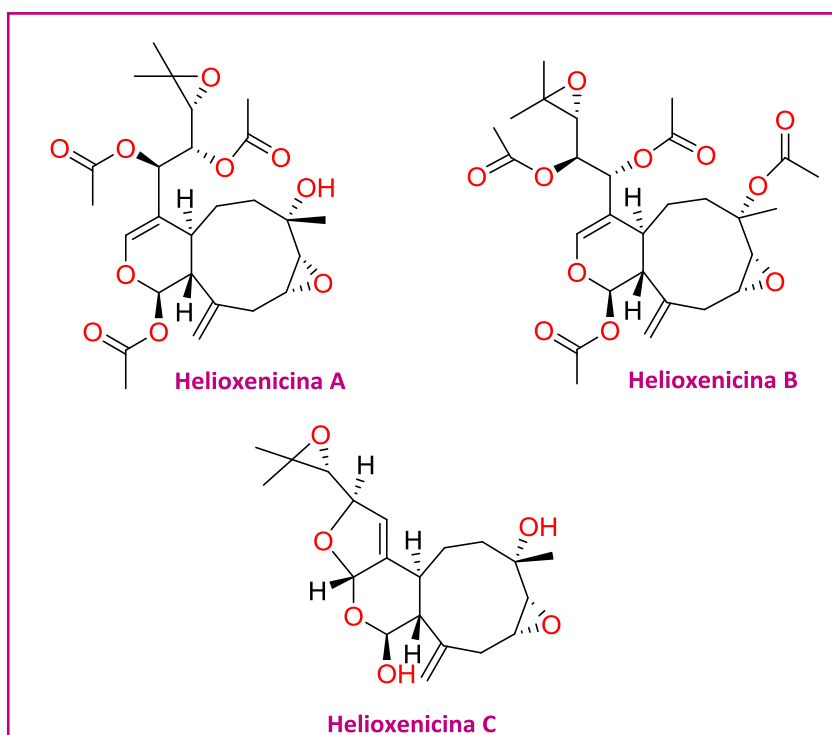


Figura 64. Estructuras de helioxenicinas A-C aisladas de *Heliopora coerulea*.

De la familia estructural de los xeniolidos se puede destacar la isoxeniolida A y la epoxixeniolida,⁵⁴ que muestran una actividad citotóxica ($IC_{50} > 1 \mu\text{g/mL}$) frente a distintos tipos de células antitumorales humanas.

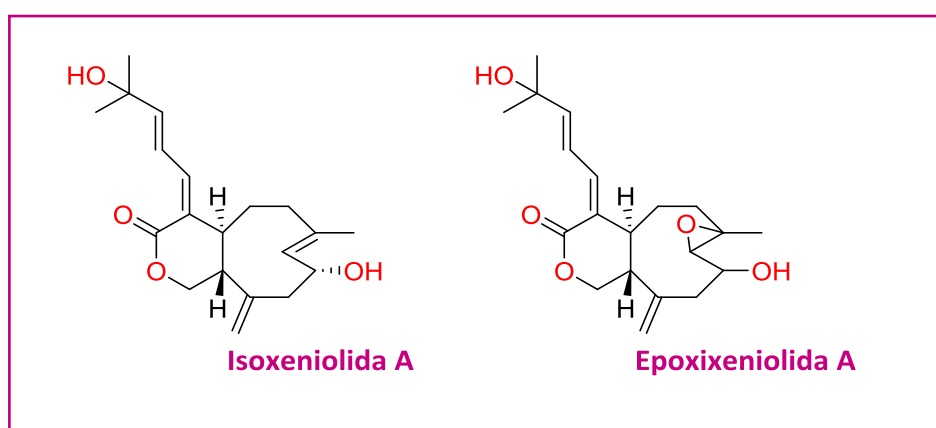


Figura 65. Estructuras de isoxeniolida A y epoxixeniolida A aisladas de *Xenia blumi*.

⁵⁴ Anta C, González N, Santafé G, Rodríguez J, Jiménez C. *J Nat. Prod*, **2002**. 65, 766-768

En 2005 se reportaron los blumiolidos,⁵⁵ destacando por su actividad citotóxica el blumiolido C, con un valor del rango sub- $\mu\text{g/ml}$.

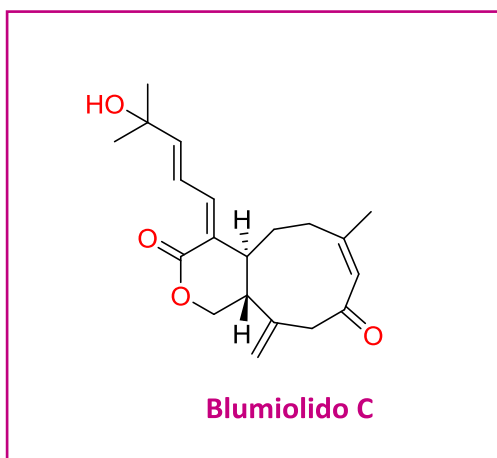


Figura 66. Estructura de blumiolido C aislada de *Xenia blumi*.

Por último, dentro de los xenicanos tipo xeniaéteres, el xeniaéter A⁵⁶ mostró actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*.

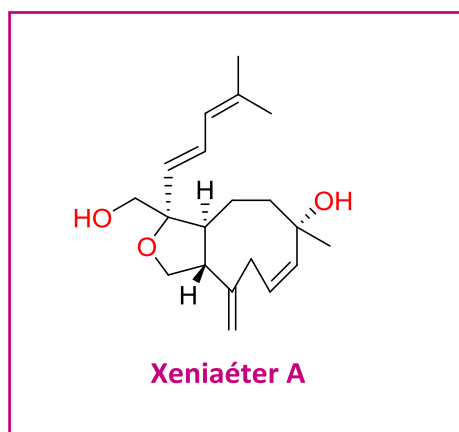


Figura 67. Estructura xeniaéter A aislada de *Xenia*.

⁵⁵ El-Gamal AAH, Chiang C-Y, Huang S-H, Wang S-K, Duh C-Y. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1336-1340.

⁵⁶ Iwagawa T, Masuda T, Okamura H, Nakatani M. *Tetrahedron.* **1996**, 52, 13121-13128.

4.2 Resultados y discusión

4.2.1 Identificación y clasificación

El coral blando *Protodendron repens* se recolectó a mano en la Isla de Okuza situada al norte de Tanzania y congelada inmediatamente por el Departamento de Expediciones de PharmaMar en octubre de 2007 (Figura 68). Fue codificada y almacenada en PharmaMar con el código ORMA51093. La identificación taxonómica de este coral fue realizada por la Dra. Susana Soto (CEAB-Centro de Estudios Avanzados de Blanes, España).

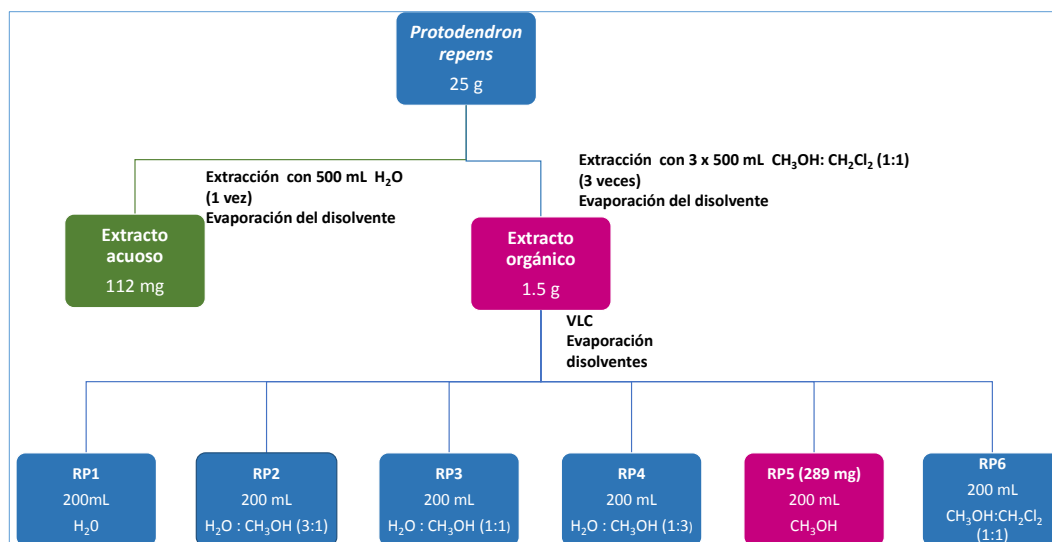


Figura 68. Fotografía del coral blando *Protodendron repens* y localización de la región donde fue recolectada.

4.2.2 Extracción y fraccionamiento

Con el fin de extraer los metabolitos secundarios causantes de la actividad, la esponja se troceó y se extrajo tres veces con una mezcla de diclorometano:metanol (1:1) para a continuación realizar una extracción con agua. El extracto orgánico resultante se fraccionó mediante cromatografía flash a vacío en fase reversa, empleándose como fase móvil distintas mezclas de disolventes en orden decreciente de polaridad, obteniéndose seis fracciones (Esquema 5). Cada fracción se sometió a un

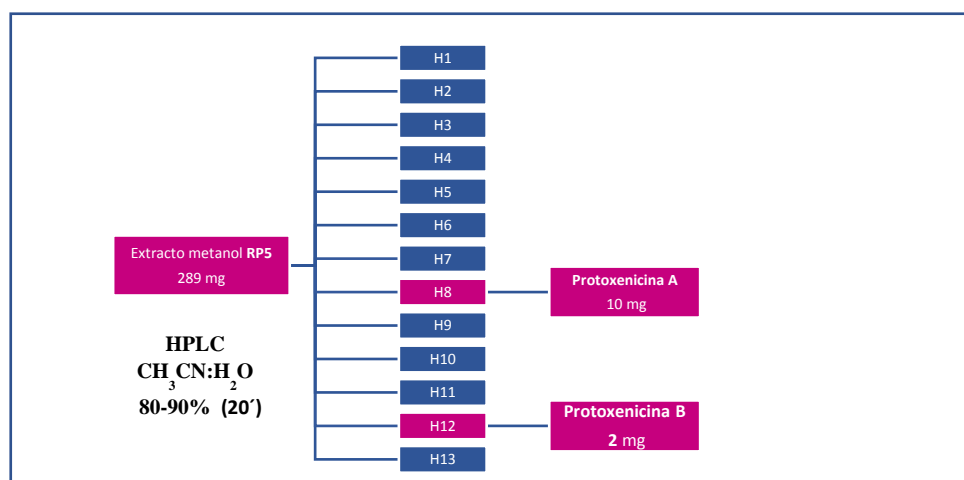
ensayo *in vitro* de actividad frente a células tumorales, mostrando que la fracción eluída con metanol era la más activa.



Esquema 5. Fraccimiento del extracto orgánico de la esponja *Protodendron repens*.

4.2.3 Aislamiento y purificación

La fracción activa RP5 se separó mediante HPLC obteniéndose 13 fracciones. El bioensayo de las fracciones obtenidas mostró que las fracciones H8 y H12 eran las únicas que mostraban actividad citotóxica. La posterior elucidación estructural de dichas fracciones permitió identificar dos compuestos puros que se denominaron protoxenicanas A y B.



Esquema 5. Esquema de aislamiento de protoxenicina A (3) y B (4) de la fracción de metanol.

4.2.4 Determinación estructural

4.2.4.1 Determinación de la estructura plana de protoxicenina A (3)

La determinación de la estructura de la protoxicenina A se llevó a cabo mediante diversas técnicas de RMN junto con los datos de espectrometría de masas. La fórmula molecular de **3** como $C_{34}H_{52}O_{11}$ (9 grados de insaturación) se determinó a partir del ion $[M+H]^+$ a m/z 637.3615 observado en su espectro de masas de alta resolución.

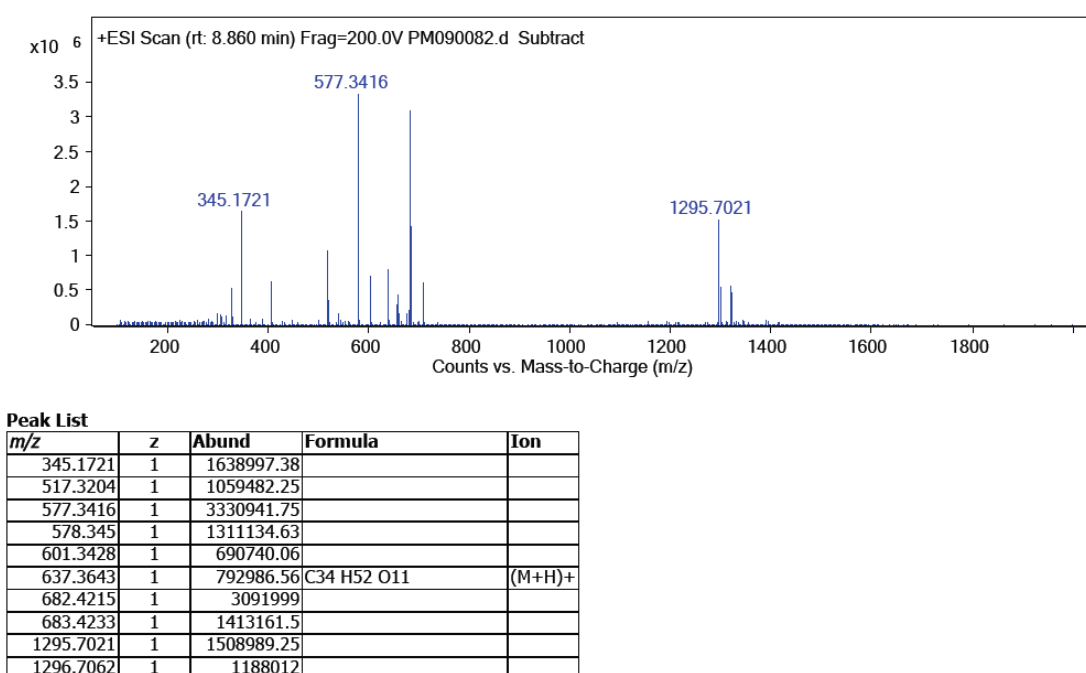


Figura 69. Espectro de masas de protoxicenina A (3).

En el espectro de RMN de ^{13}C se observan 34 señales de carbono (Tabla 12) que, junto con el estudio de los espectros de RMN 1H y HSQC se asignaron a: dos grupos acetilo (δ_C/δ_H : 169.6, 25.3 /1.61; 169.9, 21.0 /1.89), un grupo carbonilo de ester (δ_C 172.2), un doble enlace exocíclico a δ_C 147.2 y 115.9 y δ_H 5.24 y 5.71, y otro doble enlace trisustituido a δ_C 142.4 y δ_C 112.6/ δ_H 6.79), cuatro grupos metínicos oxigenados (δ_C/δ_H : 92.9/6.45; 74.1/5.89; δ_C 70.8/5.40; 68.3/4.91), un carbono no protonado (δ_C 70.2), 10 grupos metileno, dos metinos adicionales y cuatro grupos metilo. Además,

la presencia de dos grupos epóxido fue deducida por las tres señales características a δ_C/δ_H : 63.1/2.36; 64.1/3.01 y δ_C/δ_H 62.0/3.01 junto con el carbono no protonado a δ_C 58.4, confirmado por el análisis del espectro HMBC.

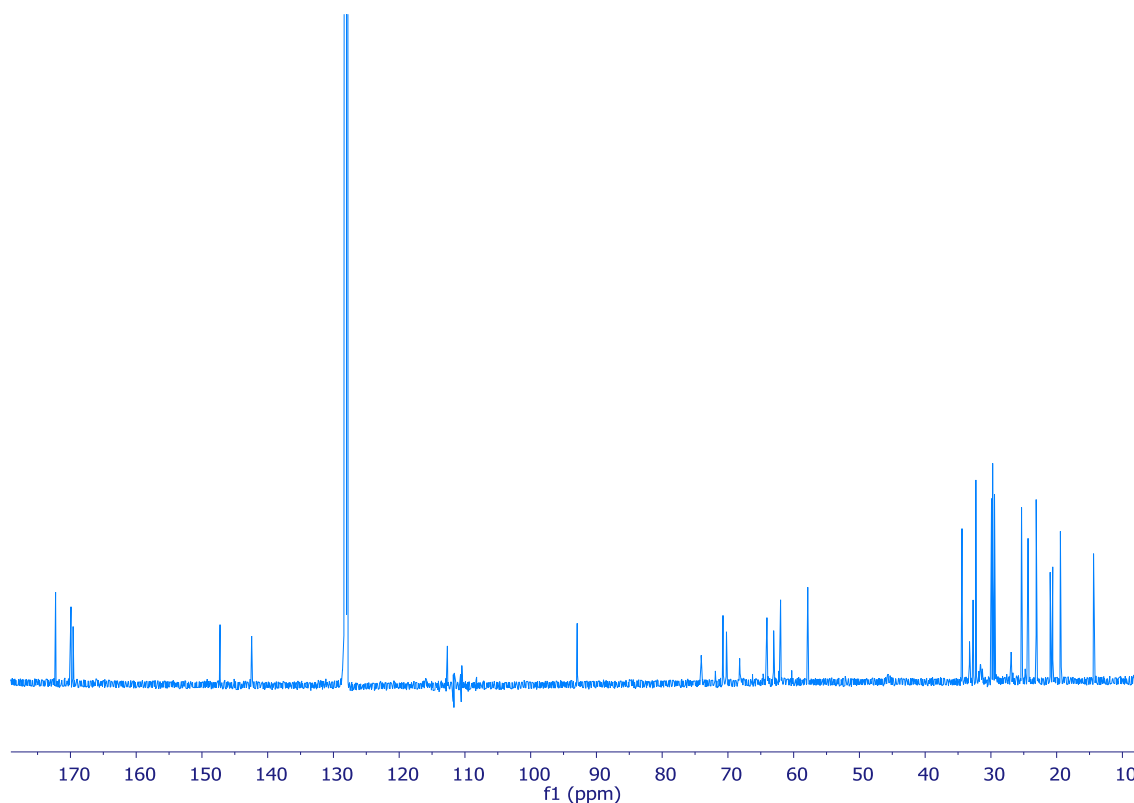


Figura 70. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, C_6D_6) de protoxenicin A (3).

El espectro de RMN ^1H (Figura 71) revela la presencia de seis señales entre 4.91 y 6.79 ppm. También se observa la presencia de seis grupos metilos: cinco singuletes a 1.89, 1.61, 1.38, 1.22 y 1.10 ppm y un triplete a 0.88 ppm.

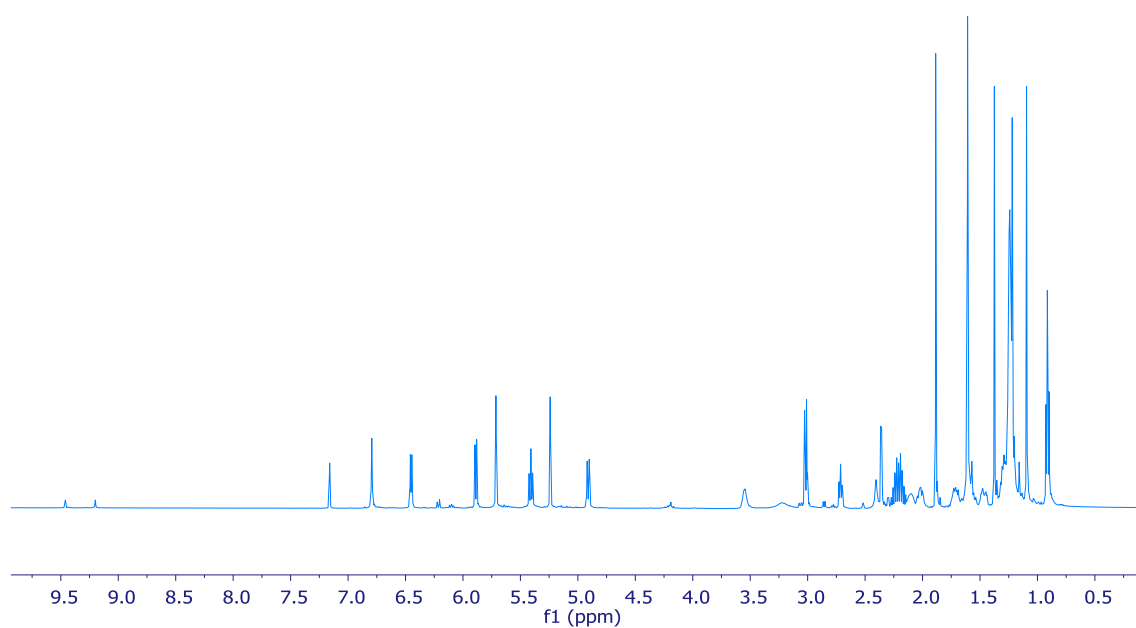


Figura 71. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, C_6D_6) de protoxenicina A (**3**).

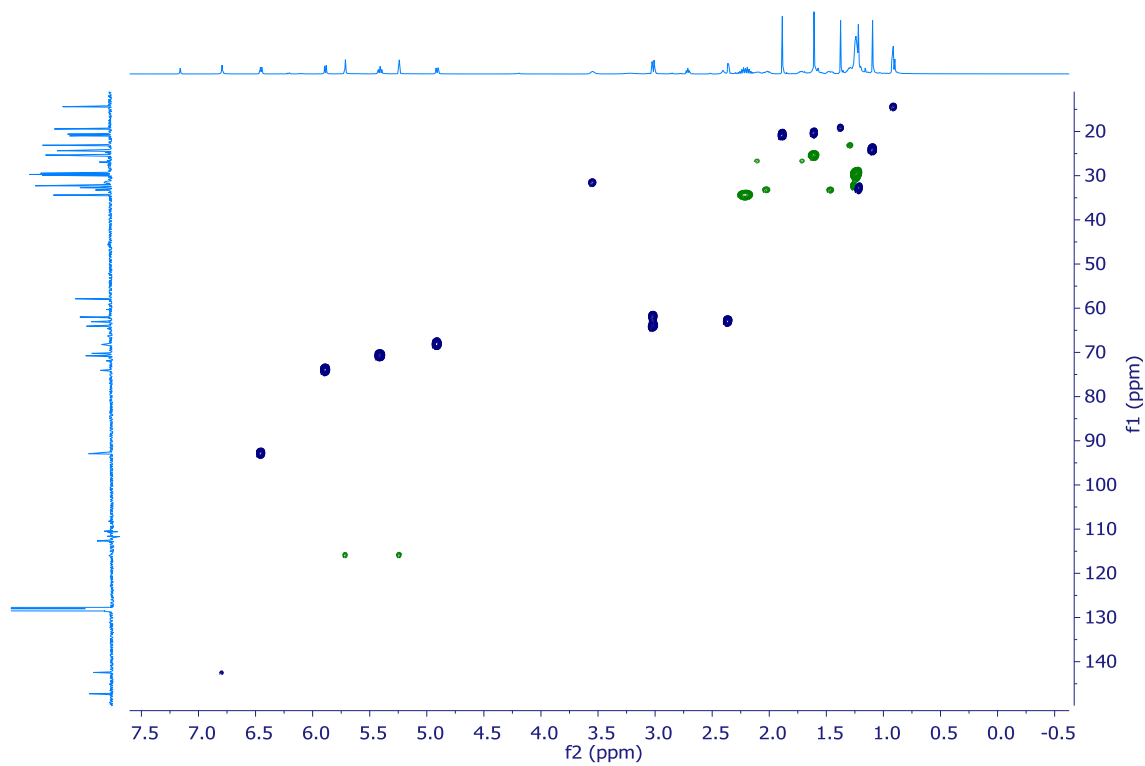
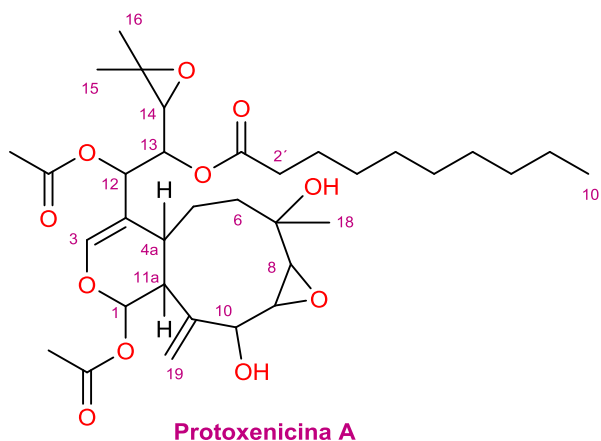


Figura 72. Espectro HSQC (500 MHz, C_6D_6) de protoxenicina A (**3**). Señales de color azul corresponden a grupos metileno.

Tabla 9. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C (500 MHz, C_6D_6) de protoxicina A (**3**).

Pos.	δ_{C} , mult.	δ_{H} , mult., J in Hz	Pos.	δ_{C} , mult.	δ_{H} , mult., J in Hz
1	92.9, CH	6.45, d (6.5)	15	58.4, C	
3	142.4, CH	6.79, d (1.7)	16	19.4, CH_3	1.38, s
4	112.6, C		17	24.3, CH_3	1.10, s
4a	31.5, CH	3.56, bs	18	29.5, CH_3	1.22, s
5	27.0, CH_2	1.71, m; 2.11, m	19	115.9, CH_2	5.24 s; 5.71 s
6	32.2, CH_2	1.46, m; 2.02, m	1'	172.2, C	.
7	70.2, C		2'	34.4, CH_2	2.21, m
8	63.1, CH	2.36, d (4.4)	3'	25.3, CH_2	1.60, m
9	64.1, CH	3.01, m	4'-7'	29.7-29.9, CH_2	1.21-1.25, m
10	68.3, CH	4.91, d (9.0)	8'	32.3, CH_3	1.28, m
11	147.2, C		9'	23.2, CH_2	1.30, m
11a	45.7, CH	2.72, d (6.5)	10'	14.4, CH_3	0.88, t (6.9)
12	74.1, CH	5.89, d (7.3)	OAc-1	169.6, C	
13	70.8, CH	5.40, dd (7.8, 7.3)		25.3, CH_3	1.61, s
14	62.0, CH	3.01, d (7.8)	OAc-12	169.9, C	
				21.0, CH_3	1.89, s



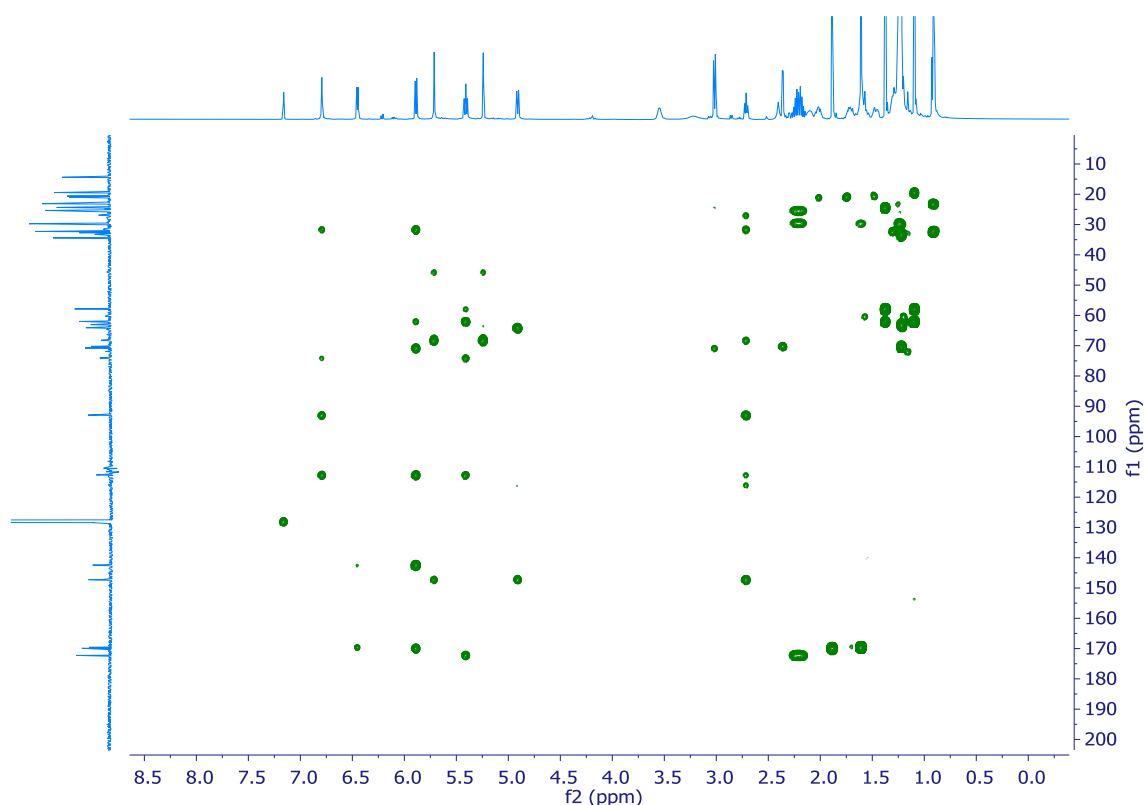


Figura 73. Espectro HMBC (500 MHz, C_6D_6) de protoxicina A (**3**).

Con la información previa descrita se pueden justificar siete de los nueve grados de insaturación presentes en la molécula, por lo que esta debería presentar dos anillos en su estructura.

El estudio del espectro 1H - 1H -COSY reveló la presencia de cuatro sistemas de espín a-d que forman parte de los fragmentos A-D (Figura 75). El espín a incluye un sistema de protones formado por H-1 (δ_H 6.45), H-11a (δ_H 2.72), H-4a (δ_H 3.56), H-5 (δ_H 1.71, 2.11) y H-6 (δ_H 1.46, 2.02). La información obtenida de este espín a, junto con las correlaciones proton-carbono a larga distancia observadas en el experimento HMBC entre H-3 (δ_H 6.79) con C-1 (δ_C 92.9), C-4 (δ_C 112.6) y C-4a (δ_C 31.5) y, teniendo en cuenta el desplazamiento de C-3 a 142.4 característico de un carbono de doble unido a oxígeno, permitió construir el fragmento A del compuesto **3** correspondiente a un anillo de 2-acetoxi-3,4-dihidropirano, característico del esqueleto de los xenicanos (xenicinas). La determinación de esta

estructura parcial fue clave para llevar a cabo la elucidación de la estructura de la protoxicenina A (**3**) debido a que en la bibliografía existen numerosos xenicanos que contienen este anillo.

Un segundo sistema de espín b, constituido por tres protones metínicos H-8 (δ_H 2.36), H-9 (δ_H 3.01) y H-10 (δ_H 4.91). El desplazamiento de los carbonos C-8 y C-9 a δ 63.1 y 64.1, respectivamente, junto con el desplazamiento a campo alto de sus protones H-8 y H-9, indican la presencia de un grupo epóxido en dicho sistema de espín dentro del fragmento denominado B.

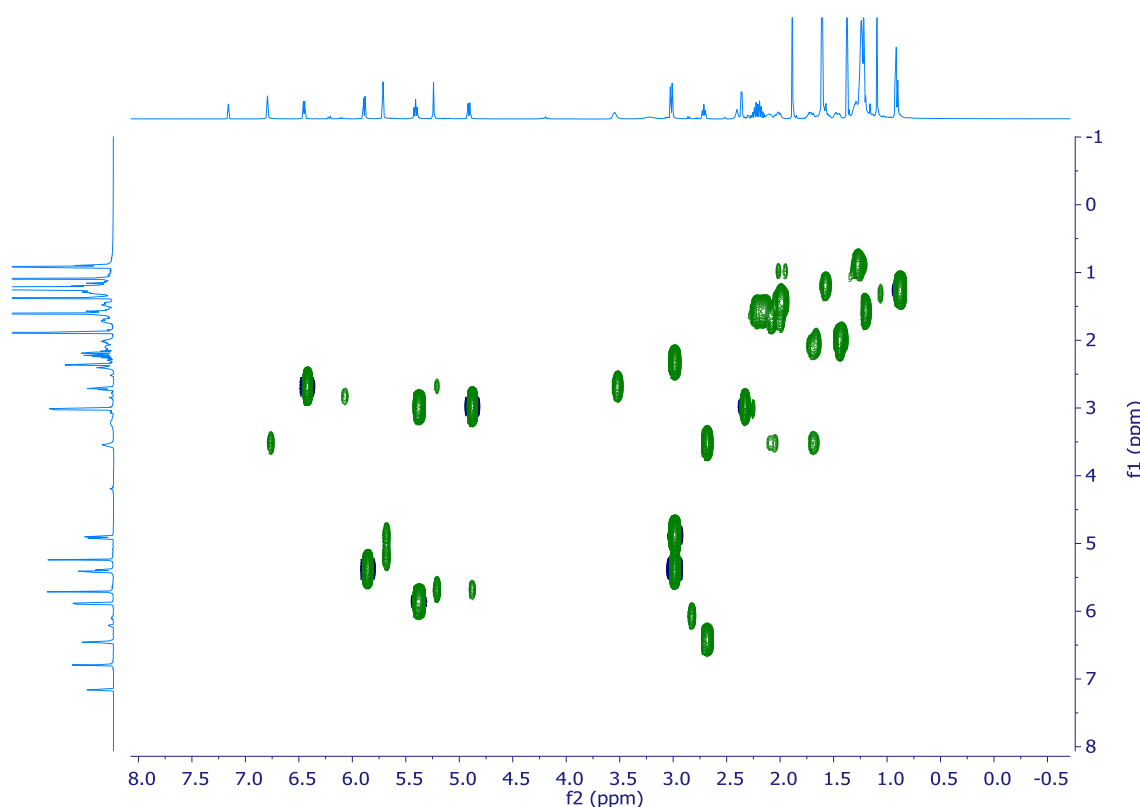


Figura 74. Espectro COSY (500 MHz, C₆D₆) de protoxicenina A (**3**).

Continuando con el análisis del espectro COSY, se dedujo un tercer sistema de espín al que hemos denominado c, que está constituido por tres protones metínicos oxigenados H-12 (δ_H 5.89), H-13 (δ_H 5.40) y H-14 (δ_H 3.01), este último característico de un protón de un anillo de epóxido.

Finalmente, un cuarto sistema de espín d, está formado por una cadena hidrocarbonada saturada de nueve átomos de carbono (radical decanoilo), desde C-2' (δ_c 34.4) hasta el metilo C-10' (δ_c 14.4).

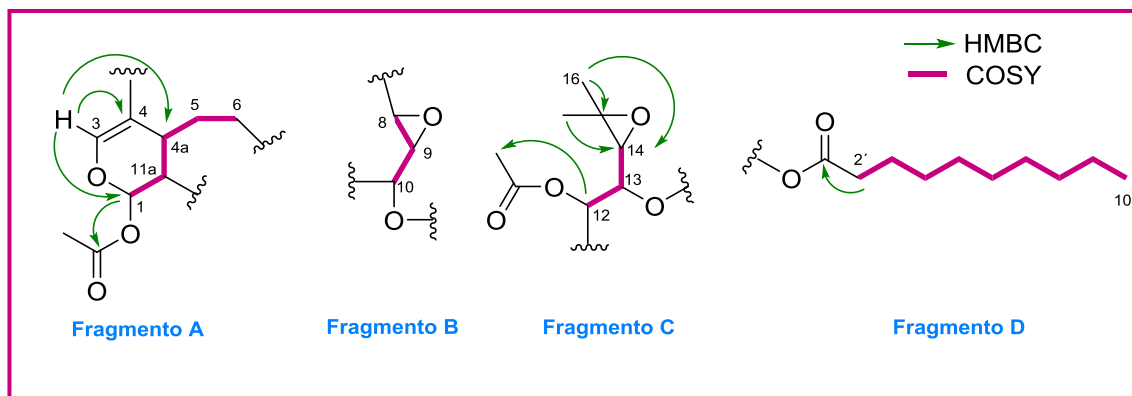


Figura 75. Sistemas de espín de los fragmentos A-D y correlaciones a larga distancia (HMBC) observadas en el compuesto **3**.

Los distintos sistemas de fragmentos se conectaron entre sí con la ayuda de las correlaciones a larga distancia observadas en el experimento HMBC. Como se muestra en la Figura 76, las correlaciones a larga distancia entre H-3 (δ_H 6.79) y C-12 (δ_C 74.1) y entre H-12 (δ_H 5.89) y C-4 (δ_C 112.6), unen el fragmento A con el fragmento C por la posición 4 del anillo de 2-acetoxi-3,4-dihidropirano.

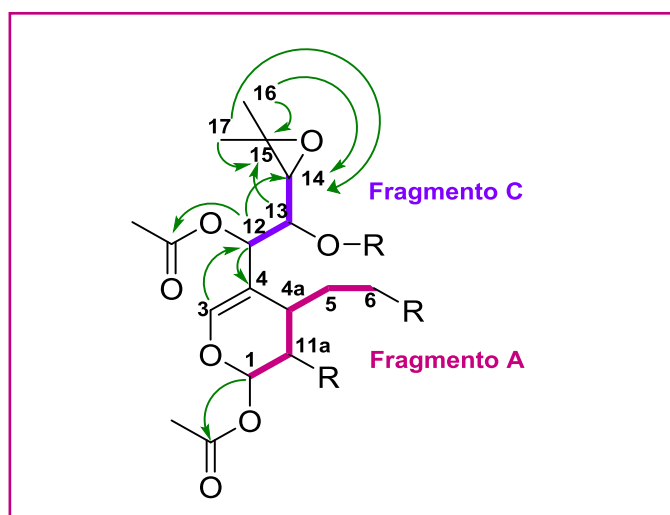


Figura 76. Unión de los fragmentos A y C mediante las correlaciones HMBC observadas.

Además, el protón en la posición 1 del fragmento A, que resuena 6.45 ppm, correlaciona a larga distancia con el carbono del grupo carbonilo a 169.6 ppm, y se observa, además, una correlación entre H-12 (δ_H 5.89) y un carbono de carbonilo a 169.9 ppm. Ambos carbonilos correlacionan con dos metilos singuletes a 1.61 y 1.89 ppm, por lo que se deduce que las posiciones H-1 y H-12 se encuentran esterificadas con un grupo acetato: OAc-1 ($\delta_{C=O}$ = 169.6, δ_C = 25.3; δ_H = 1.61) y OAc-12 ($\delta_{C=O}$ = 169.9, δ_C = 21.0; δ_H = 1.89). Por último, las correlaciones a larga distancia observadas entre dos metilos singuletes, H-16 (δ_H 1.38) y H-17 (δ_H 1.10), con C-15 (δ_C 58.4) y C-14 (δ_C 62.0), indican que hay un grupo epóxido trisustituído en fragmento C.

Las correlaciones observadas en el experimento HMBC del carbono del grupo carbonilo a 172.2 ppm con el protón H-13 (δ_H 5.40) del fragmento B y de los protones metilénicos H-2' (δ_H 2.21) del fragmento D, permite unir dichos fragmentos, tal como se muestra en la figura 80.

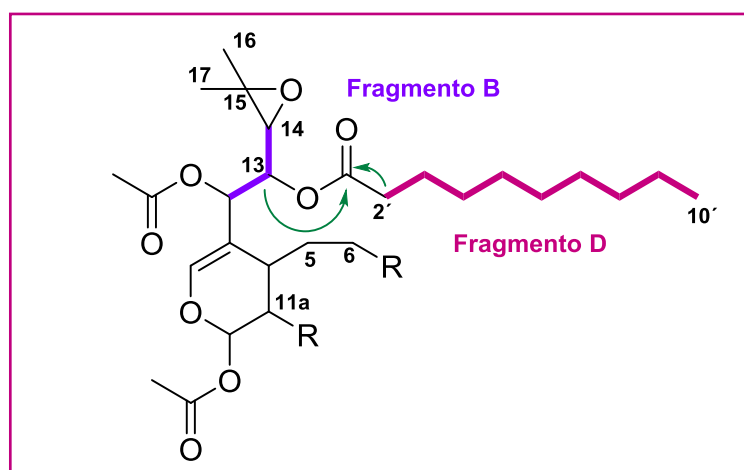


Figura 77. Unión de los fragmentos B y D mediante las correlaciones HMBC observadas.

Por último, la unión entre los fragmentos A y B se estableció a través de un doble enlace exocíclico formado por los carbonos C-11 y C-19. Las correlaciones observadas en el experimento HMBC entre H-10 (δ_{H} 4.91) con C-11 (δ_{C} 147.2) y entre H-19 (δ_{H} 5.24, 5.71) con C-11a (δ_{C} 45.7) y C-10 (δ_{C} 68.3), junto con las correlaciones entre H-6 (δ_{H} 1.46, 2.02) y H-8 (δ_{H} 2.36) con el carbono oxigenado no protonado C-7 (δ_{C} 70.2) y H-18 (δ_{H} 1.22) con C-6 (δ_{C} 32.2), C-7 (δ_{C} 70.28) y C-8 (δ_{C} 63.1) confirman esta unión (Figura 78), y nos permite establecer la presencia en **3** de un sistema de anillo 11-oxabicyclo[7.4.0] tridecano con un cetel acetilado cetel similar a los encontrados en otro xenicanos. De esta forma se completa la estructura plana y además se justifica la fórmula molecular con los nueve grados de insaturación.

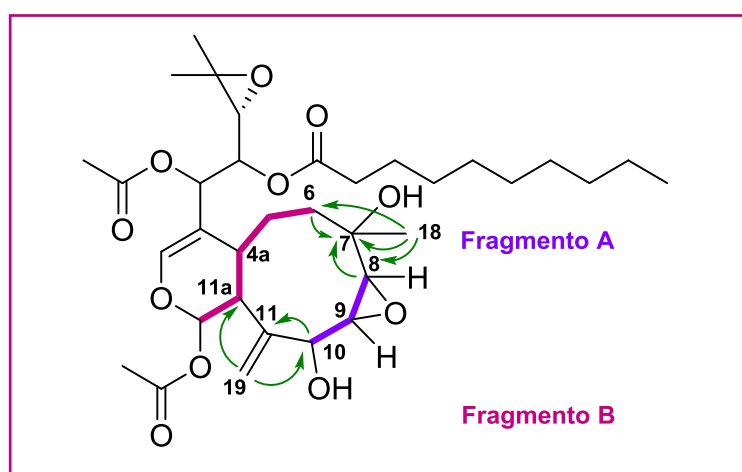


Figura 78. Unión de los fragmentos A y B mediante las correlaciones HMBC observadas.

4.2.4.2 Determinación de la configuración relativa y absoluta de la protoxenicina A (**3**).

La configuración relativa de $1R^*$, $4aS^*$, $11aR^*$ del anillo de 1-hidroxiacetoxidihidropirano en las posiciones, se obtuvo mediante la comparación con los datos espectroscópicos de RMN en C_6D_6 de la helioxenicina A (figura 67), aislada de coral *Heliopora coerulea*, junto con las correlaciones NOESY observadas en **3**. Dicha molécula y protoxenicina A (**3**) presentan la misma estructura plana en los dos anillos mientras que la estereoquímica relativa de la helioxenicina A se determinó mediante estudios de cristalografía de difracción de rayos X.⁵⁷

La configuración relativa de $7S^*$, $8R^*$, $9R^*$ en el anillo de ciclononano también se dedujo mediante el experimento ROESY. Correlaciones desde NOE el Me-18 a H-9 y H-8, y de este último con H-11a, mostró que estos protones están situados en la misma cara del sistema de anillos, asignado arbitrariamente como β , mientras que las correlaciones NOE desde H-10 a H-1 y H-4a, sugiere que estos protones se encuentran situados en la cara opuesta (α) del anillo. Esta orientación revela que la fusión entre los dos anillos es *trans*, tal como sucede en la helioxenicina A y en todos los xenicanos descritos. Los desplazamientos químicos de carbono y protón para las posiciones C-5 y C-9 junto con las constantes de acoplamiento correspondiente al anillo de epóxido 8,9-*cis* ($J_{H8/H9} = 4,0$ Hz) en **3** coincidieron con los datos observados para helioxenicina A, que tiene posee un fragmento C-5 /C-9 idéntico con el pero sin el grupo hidroxilado en C-10.

De la misma forma y comparando con los datos de la helioxenicina A, se determinó la configuración relativa de las posiciones 12, 13 y 14 como

⁵⁷ Tanaka, J.; Ogawa, N.; Liang, J.; Higa, T.; deNys, R.; Bowden, B. F.; Carroll, A. R.; Coil, J. C.; Bernardinelli, G.; Jefford, C. W. *Tetrahedron* **1994**, 50, 9989–9996.

12*R**,13*R**,14*R**. Una búsqueda conformacional utilizando el programa MacroModel con el módulo Monte Carlo da lugar a un conformero con una mínima energía que explica las correlaciones NOE observadas en el espectro 1H-1H ROESY de **3**. (Figura 79)

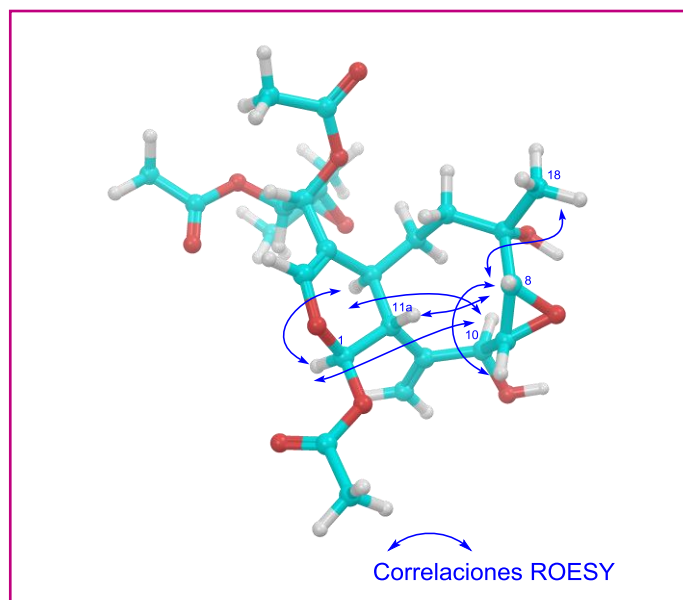


Figura 79. Correlaciones NOE sobre conformero más estable encontrado en la búsqueda conformacional de **3**.

Una vez determinada la estereoquímica relativa de **3**, se pudo determinar la configuración absoluta en la posición 10 que se dedujo mediante la aplicación del método de Mosher para alcoholes quirales. El compuesto **3** se convirtió en el éster (*S*)- α -metoxi- α -(trifluorometil) fenilacético (MTPA) (**3a**) y a (*R*)-MTPA éster (**3b**) por adición del cloruro R-(-)- or S-(+)-MTPA en dos tubos separados de RMN en que se encuentra **3** en una solución de piridina-*d*₅. De los espectros de RMN ¹H se calcularon las diferencias de desplazamientos químicos entre ambos ésteres ($\Delta\delta = \delta_S - \delta_R$), obteniéndose los valores $\Delta\delta_H$ -0,01 (H-1), -0,04 (H-4a), +0,05 (H-8), +0,03 (H-18) y -0,18, -0,25 (H-19), que sólo son compatibles con una configuración *S* en C-10 (Figura 80). La determinación de la estereoquímica de C-10 nos permitió determinar la configuración absoluta

de los demás centros estereogénicos del anillo de ciclononano y en C-1: $1R, 4aS, 7S, 8R, 9R, 10S, 11aR, 12R^*, 13R^*$.

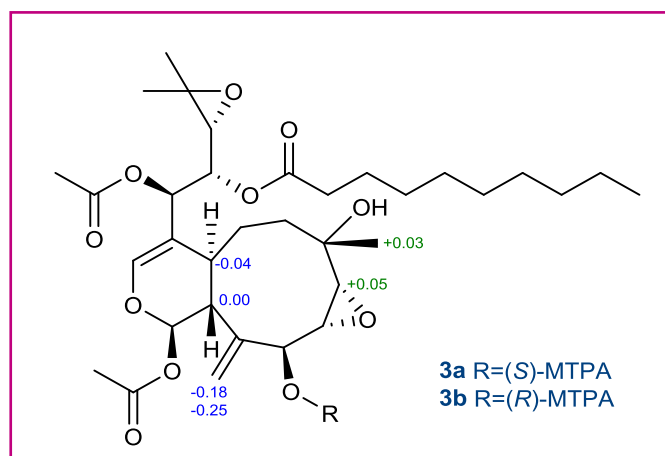
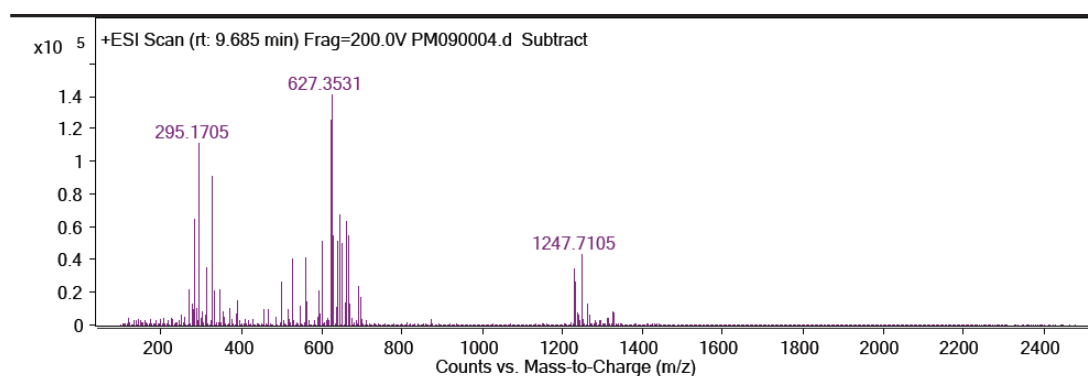


Figura 80. Valores $\Delta\delta$ ($\delta_S - \delta_R$) en ppm para los esteres MTPA de **3**.

4.2.4.3 Determinación de la estructura plana de protoxenicina B (**4**)

El segundo compuesto aislado al que hemos denominado protoxenicina B, se purificó a partir de la fracción de HPLC H12. Su estructura se determinó mediante diversas técnicas de RMN junto con los datos de espectrometría de masas y la comparación con los datos bibliográficos de protoxenicina A (**3**). Su fórmula molecular de $C_{34}H_{52}O_9$ fue deducida a partir del ion correspondiente al aducto de sodio $[M+Na]^+$ m/z de 627.3531 a partir del espectro de alta resolución (+)-HRESTOFMS, indicando 9 grados de insaturación



Peak List

m/z	z	Abund
285.1516	1	65169.05
295.1705	1	111303.25
329.1761	1	90783.92
622.3971	1	125669.53
627.3531	1	140674.41
628.3559	1	55167.42
641.3323	1	51747.4
643.3429	1	67344.68
664.4082	1	63377.65
666.4202	1	54334.27

Figura 81. Espectro de masas de protoxenicina B (**4**).

El compuesto **4** muestra un único pico en cromatograma de HPLC (Figura 82) y un solo ion a m/z 627 $[M+Na]^+$. Sin embargo, al realizar el espectro de RMN 1H se observó que el espectro parece que está formado por un componente mayoritario y otro minoritario en una relación 2:1 (Figura 83). Se realizaron varios intentos de purificación en HPLC de H12 y como resultado siempre se obtuvo un solo pico cromatográfico. Debido a la poca cantidad obtenida se decidió realizar la elucidación del componente mayoritario, ya que el espectro de 1H presenta motivos estructurales muy parecidos a los de protoxenicina A (**3**). Un análisis exhaustivo de sus espectros de RMN 1H , ^{13}C y HSQC-editado de H12, indica un alto grado de similitud entre el componente mayoritario, señalado en la Figura 83 en color magenta, y el minoritario en color verde, lo que sugiere que ambas estructuras son muy semejantes.

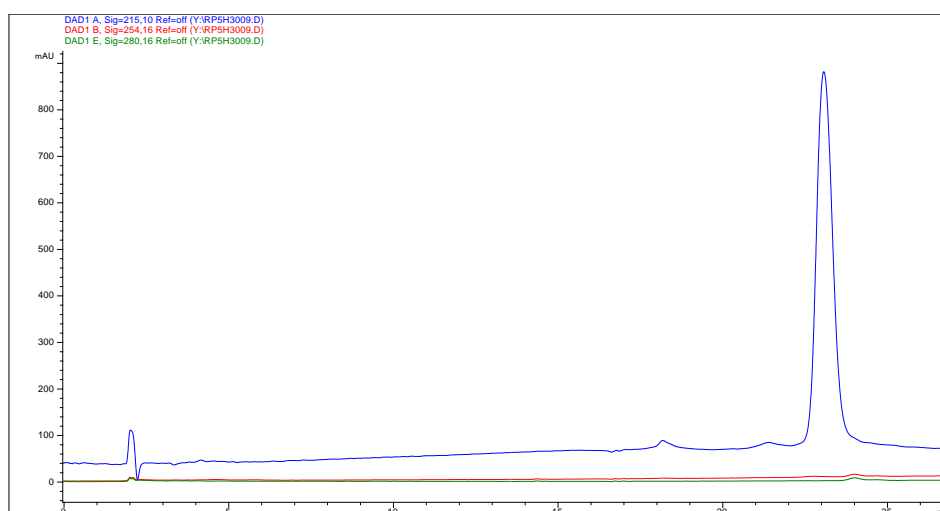


Figura 82. Cromatograma de HPLC de la fracción H12. Columna Waters XTerra MS, 10 x 150 mm. Fase móvil: gradiente 70% al 90% en CH₃OH en 30 min, flujo 3.7 mL/min.

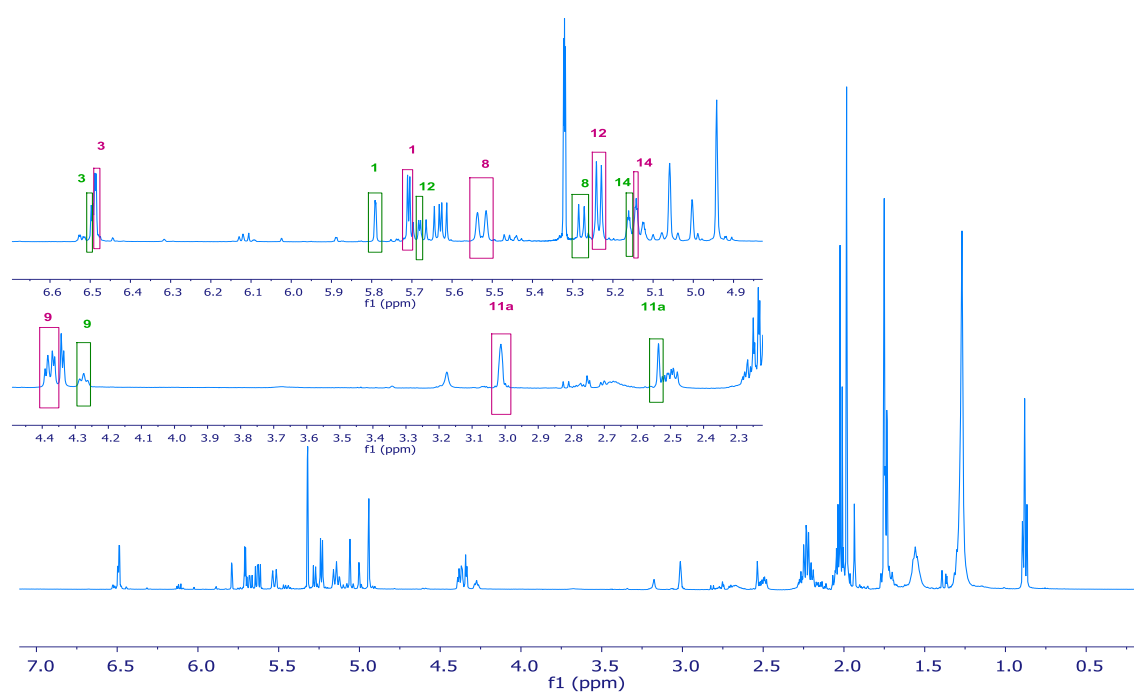


Figura 83. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CD₂Cl₂) y diferencias entre compuesto mayoritario (color magenta) y minoritario (color verde) presentes en el compuesto protoxicina B (**4**).

Las diferencias más significativas en los desplazamientos químicos de las señales en el espectro de RMN de ^1H de **4**, corresponden a los protones H-8 y H-11a y H-12, mientras que para el caso del espectro de RMN ^{13}C la mayor diferencia se encuentra en el carbono de la posición C-8.

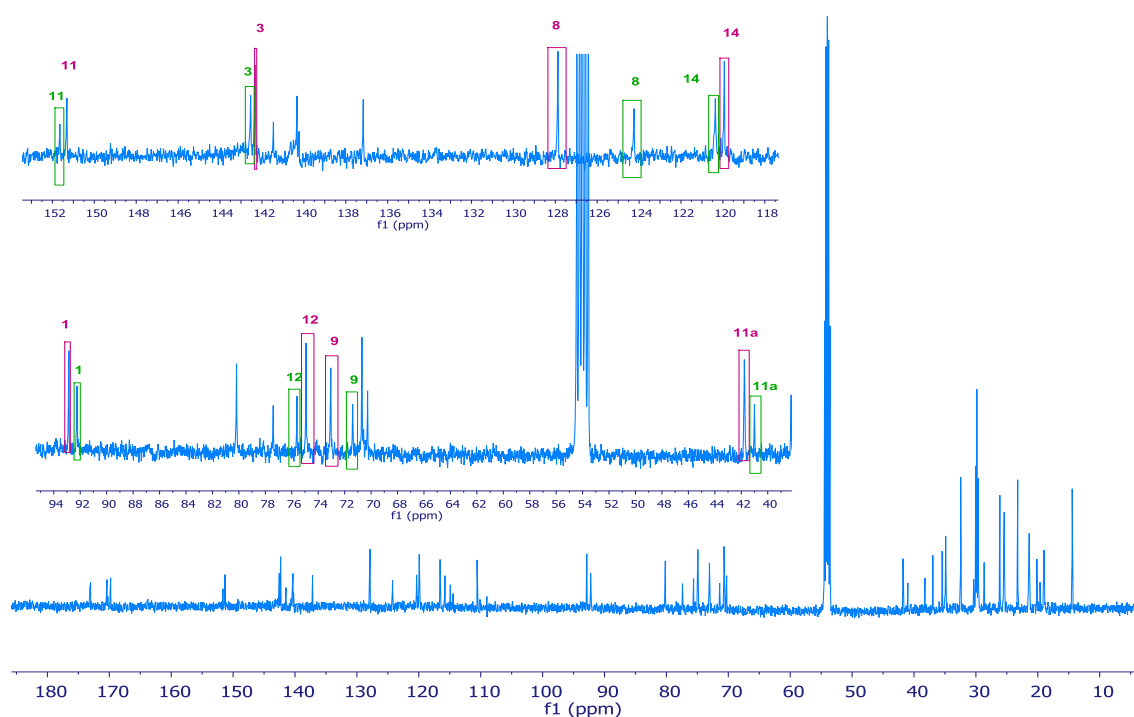


Figura 84. Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, CD_2Cl_2) y diferencias entre compuesto mayoritario (color magenta) y minoritario (color verde) de protoxenicina B (**4**).

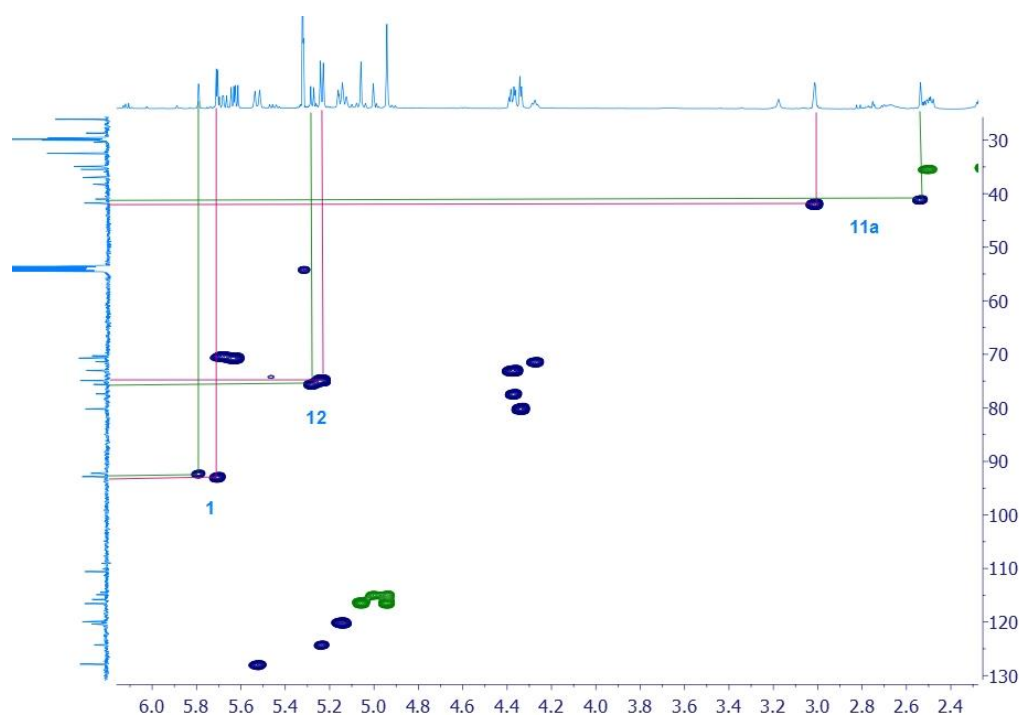


Figura 85. Espectro de RMN HSQC-editado (500 MHz, CD_2Cl_2) y diferencias en las posiciones 1, 11a y 12 entre compuesto mayoritario (color magenta) y minoritario (color verde) de protoxenicina B (**4**).

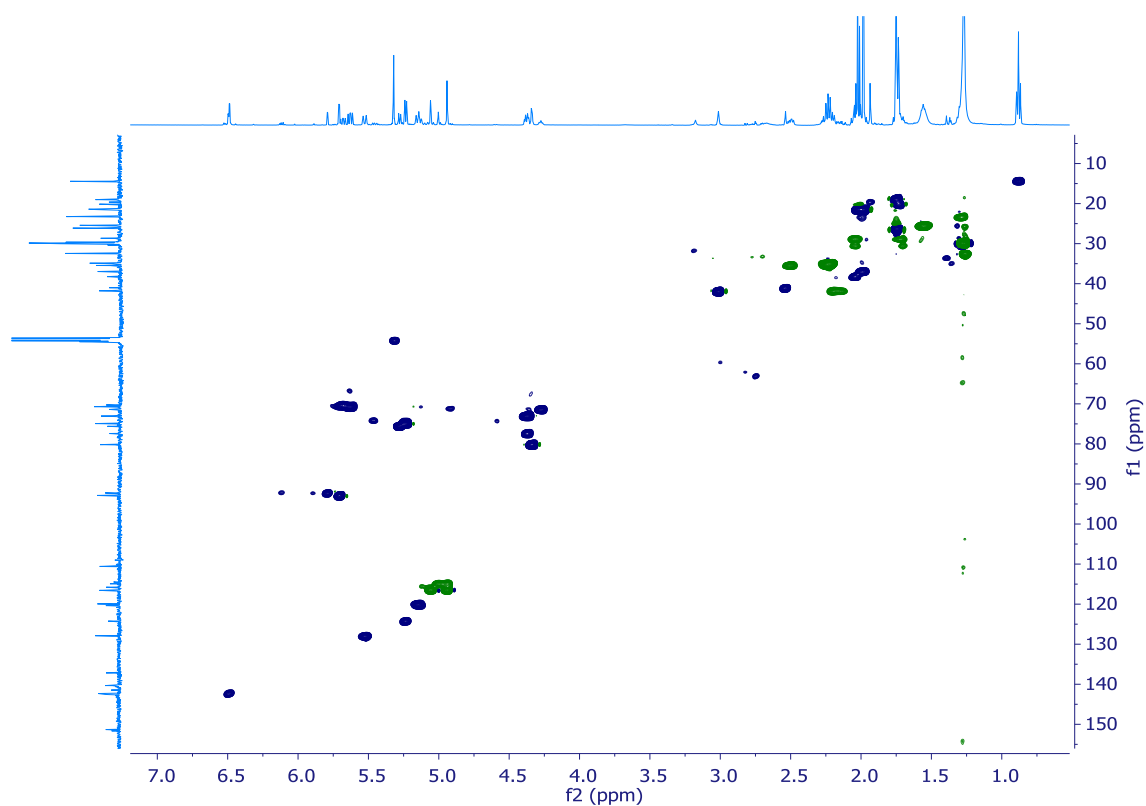


Figura 86. Espectro de RMN HSQC-editado (500 MHz, CD_2Cl_2) de protoxenicina B (**4**). Señales de color azul corresponden a grupos metileno.

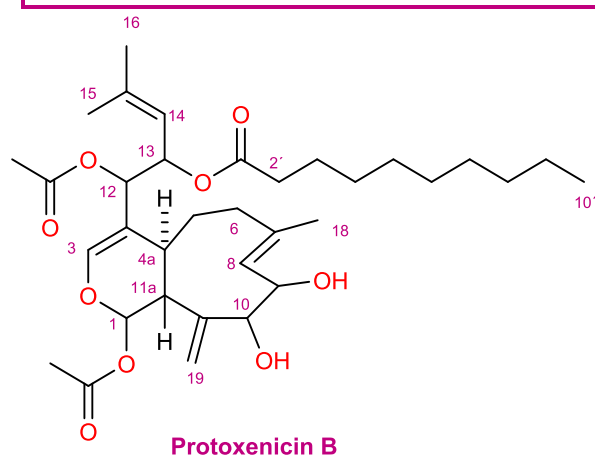
El estudio del espectro de RMN ^{13}C de **4** (Figura 84) reveló la presencia de 34 señales que se asignaron con la ayuda de espectro de RMN ^1H (Tabla 10) y HSQC-editado (Figura 86) de la siguiente manera: 11 señales de carbono a más ppm (δ_{C} 173.0-115.8) de los cuales tres son grupos carbonilos y ocho carbonos de doble enlace, cinco señales con un desplazamiento entre 70.7 y 92.9 característicos de carbonos unidos a oxígeno y finalmente 18 señales que corresponden a diez grupos metilenos, seis grupos metilos y a dos grupos metinos.

El espectro de RMN ^1H de **4** (Figura 83) revela la presencia de nueve señales entre 4.34 y 6.49 ppm. También, como en el caso de la protoxenicina A (**3**), se observa la presencia de seis metilos: cinco singuletes a 1.73, 1.75, 1.75, 1.98 y 2.03 ppm y un metilo triplete a 0.88 ppm.

Las principales diferencias que se encontraron entre la protoxenicina A (**3**) y B (**4**) tras el estudio de los datos de RMN ^1H y ^{13}C fueron dos: la desaparición de las señales correspondientes a los cuatro carbonos oxigenados asignados a grupos epóxidos (δ_{C} 58.4, 62.1, 63.4 y 63.9) y la presencia de cuatro señales atribuibles a carbonos de doble enlace (δ_{C} 120.0, 127.9, 137.1 y 140.0). Estos datos junto con la comparación entre las fórmulas moleculares de protoxenicina A (**3**) ($\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_{11}$) y protoxenicina B (**4**) ($\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_9$), sugieren que los dos grupos epóxidos existentes en protoxenicina A (**3**) son sustituidos por dos dobles enlaces en la protoxenicina B (**4**).

Tabla 10. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C (500 MHz, CD_2Cl_2) de protoxicina B (**4**).

Pos.	δ_{C} , mult.	δ_{H} , mult., J in Hz	Pos.	δ_{C} , mult.	δ_{H} , mult., J in Hz
1	92.9, CH	5.71, d (2.7)	15	140.2, C	
3	142.3, CH	6.49, d (1.7)	16	26.1, CH_3	1.75, s
4	115.8, C		17	19.0, CH_3	1.75, s
4a	36.7, CH	1.99, m	18	20.1, CH_3	1.73, s
5	28.7, CH_2	1.73, m; 2.04, m	19	116.5, CH_2	4.95, s; 5.06, s
6	35.5, CH_2	1.23, m; 2.50, m	1'	173.0, qC	
7	137.1, C		2'	34.7, CH_2	2.23, m
8	127.9, CH	5.53, d (10.8)	3'	25.5, CH_2	1.56, m
9	73.3, CH	4.39, dd (10.8, 3.7)	4'-9'	29.8, CH_2	1.27, m
10	80.2, CH	4.34, d (3.7)	10'	14.4, CH_3	0.88, t (6.9)
11	151.9, C		OAc-1	169.8, C	
11a	41.7, CH	3.01, bs		21.4, CH_3	2.03, s
12	74.9, CH	5.24, d (6.2)	OAc-12	170.4, C	
13	70.7, CH	4.63, dd (9.2, 6.2)		21.4, CH_3	1.98, s
14	120.0, CH	5.14, dd (9.2, 1.3)			



La elucidación de la estructura plana de **4** se llevó a cabo de forma similar a como se hizo para el caso de la protoxicenina A (**3**). Mediante las correlaciones a larga distancia observadas en el espectro de HMBC, se asignaron dos grupos acetato: OAc-1 ($\delta_{C=O}$ = 169.8, δ_C = 21.4; δ_H = 2.03) y OAc-2 ($\delta_{C=O}$ = 170.4, δ_C = 21.5; δ_H = 1.98). Además se asignó un grupo carbonilo ($\delta_{C=O}$ = 173.0) y ocho carbonos de doble enlace: C-3 (δ_C 142.3), C-4 (δ_C 115.8), C-7 (δ_C 137.1), C-8 (δ_C 127.9), C-11 (δ_C 151.3), C-14 (δ_C 120.0), C-15 (δ_C 140.2) y C-19 (δ_C 116.5).

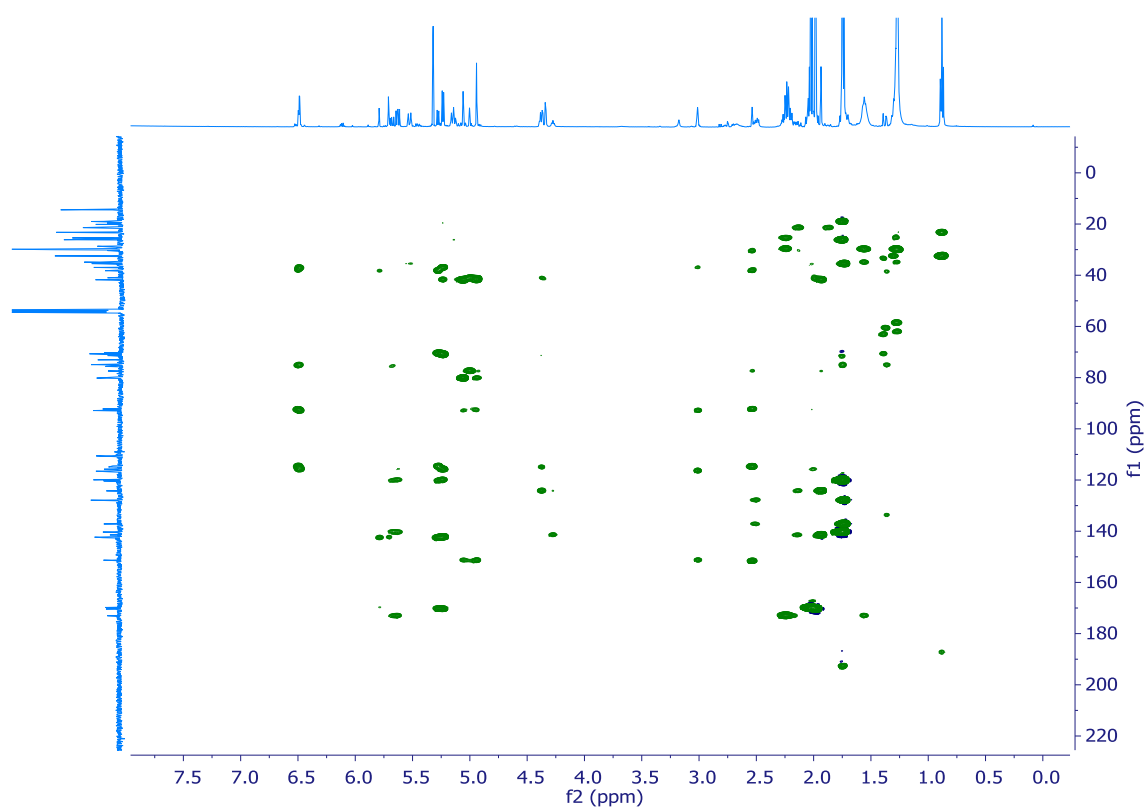


Figura 87. Espectro HMBC (500 MHz, CD₂Cl₂) de protoxicenina B (**4**).

De la misma manera que para el caso de la protoxicenina A (**3**), el espectro ¹H-¹H COSY de **4** (Figura 88) mostró la presencia de cuatro sistemas de espín a-d (Figura 89). El fragmento A, que contiene sistema de espín a-d formado formado por H-1 (δ_H 5.71), H-11a (δ_H 3.01), H-4a (δ_H 1.99), H-5 (δ_H 1.73, 2.04) y H-6 (δ_H 1.23, 2.50). Un segundo sistema de espín b

constituido por el protón de doble enlace H-8 (δ 5.53), los metinos oxigenados H-9 (δ_{H} 4.39), H-10 (δ_{H} 4.34) y el metilo singulete sobre doble enlace H-18 (δ_{H} 1.73). Un tercer sistema de espín c incluye una secuencia de tres metinos oxigenados constituidos por H-12 (δ_{H} 5.24), H-13 (δ_{H} 5.63) y H-14 (δ_{H} 5.14), siendo H-14 un protón de doble enlace por el desplazamiento de su carbono C-14 a 120 ppm. Finalmente, un cuarto sistema de espín d, que está formado por una cadena hidrocarbonada de nueve átomos de carbono (radical decanoilo), empezando desde C-2' (δ_{H} 34.7) y finalizando en el metilo C-10' (δ_{H} 14.4).

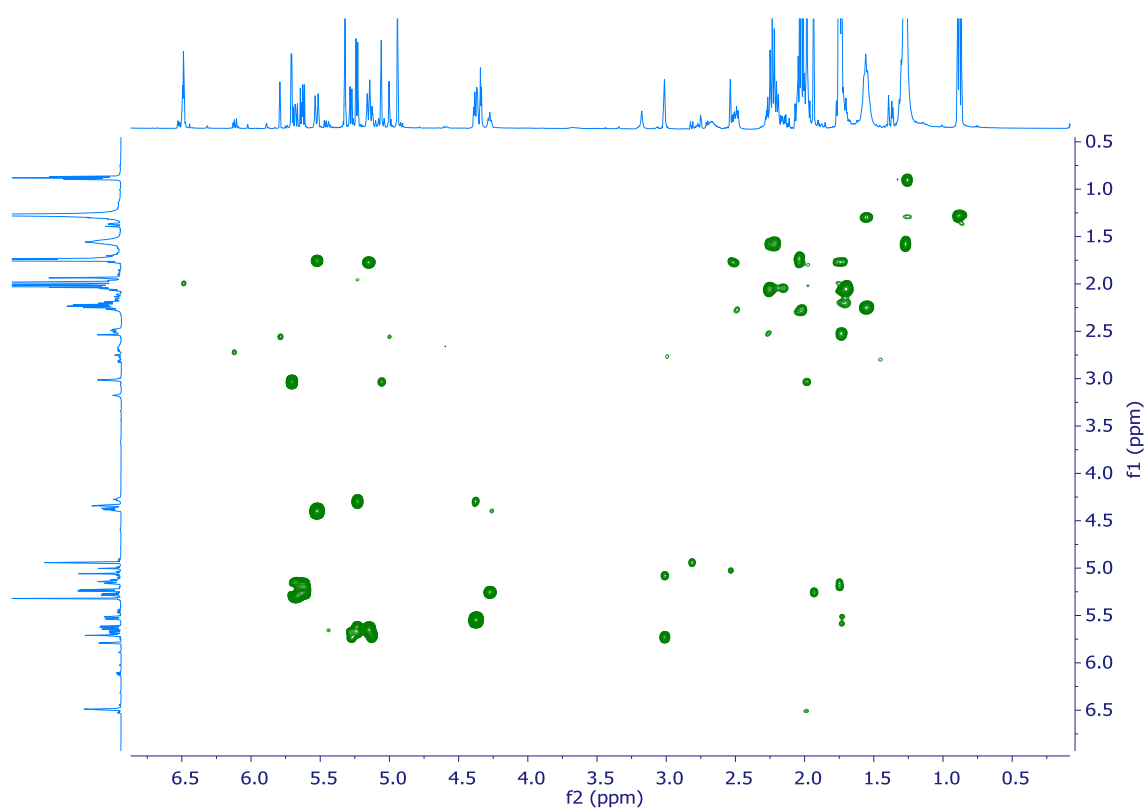


Figura 88. Espectro COSY (500 MHz, CD_2Cl_2) de protoxenicina B (**4**).

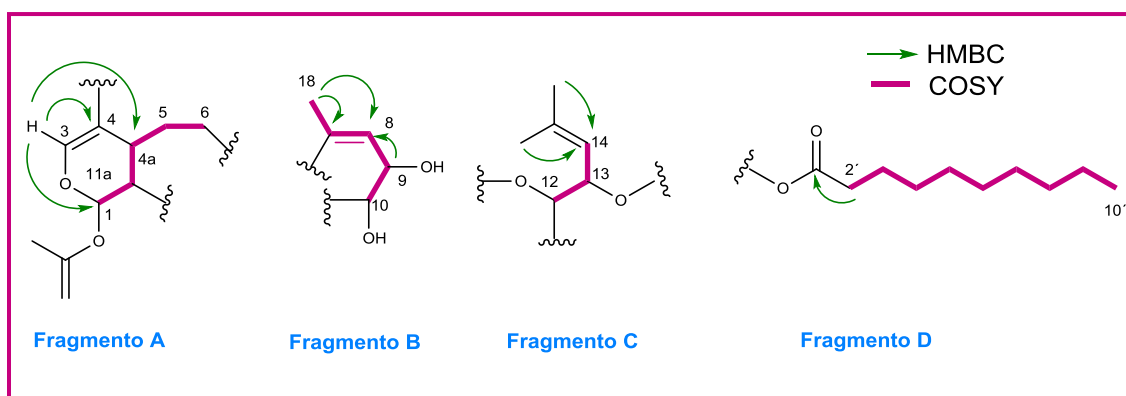


Figura 89. Sistemas de espín de los fragmentos A-D y correlaciones a larga distancia (HMBC) observadas en el compuesto **4**.

Mediante las correlaciones a larga distancia observadas en el experimento HMBC pudimos unir los cuatro fragmentos. Como se muestra en la Figura 90, una correlación a larga distancia entre H-3 (δ_H 6.49) y C-12 (δ_C 74.9) y entre H-12 (δ_H 5.24) y C-4 (δ_C 115.8), une el fragmento A con el C por la posición 4 del anillo de 2-acetoxi-3,4-dihidropirano. Las correlaciones observadas en el experimento HMBC en los fragmentos A y C permiten establecer que las posiciones H-1 y H-12 se encuentran esterificadas con dos grupos acetato diferentes: OAc-1 ($\delta_{C=O}$ 169.8, δ_C 21.4; δ_H 2.03) y OAc-12 ($\delta_{C=O}$ 170.4, δ_C 21.5; δ_H 1.98), ya que el protón H-1 (δ_H 5.71) y protón H-12 (δ_H 5.24) correlacionan a larga distancia con los carbonos de los grupos carbonilo a 169.8 ppm y 170.4 ppm, que a su vez, correlacionan con dos metilos singuletes a 2.03 y 1.98 ppm, respectivamente. Además, las correlaciones HMBC observadas entre dos metilos singuletes, H-16 (δ_H 1.75) y H-17 (δ_H 1.75), con C-14 (δ_C 120.0) y C-15 (δ_C 140.2) y por los desplazamientos químicos que presentan, señalan la existencia de un doble enlace trisustituído.

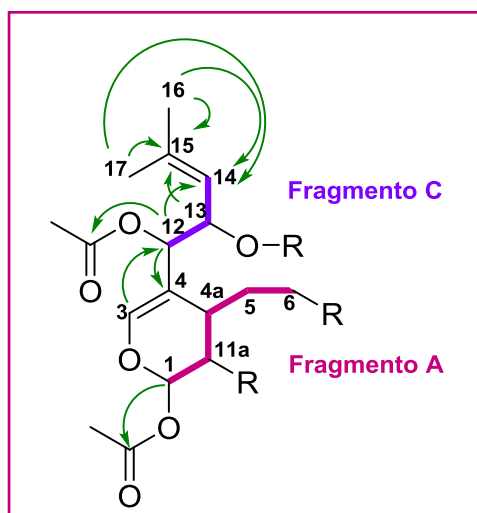


Figura 90. Unión de los fragmentos A y C mediante las correlaciones HMBC observadas.

Siguiendo con el análisis de las señales observadas en el espectro HMBC se observa dos correlaciones entre los protones H-13 (δ_H 5.63) y H-2' (δ_H 2.23) con el carbonilo C-1' (δ_C 173.0), permitiéndonos unir el fragmento C con el fragmento D a través de un grupo ester (Figura 91).

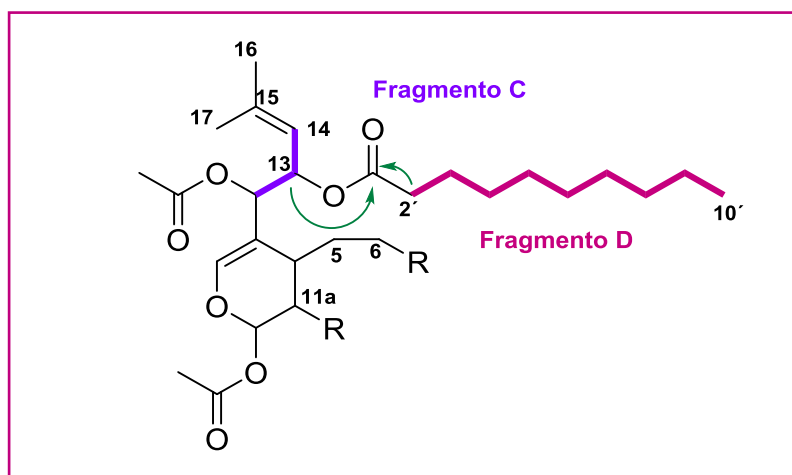


Figura 91. Unión de los fragmentos A y D mediante las correlaciones HMBC observadas.

Por último, se unieron los fragmentos A y B a través de las correlaciones a larga distancia entre el metileno H- 6 (δ_H 1.23, 2.50) con el carbono de doble enlace C-7 (δ_C 137.1) y con el metilo C-18 (δ_C 20.1), entre el protón de doble enlace H-8 (δ_H 5.53) con C-7 (δ_C 137.1) y el metilo singulete H-18 (δ_H 1.73) con el doble enlace C-7 (δ_C 137.1) y C-8 (δ_C 127.9).

Del mismo modo que para el caso de la protoxicenina A (**3**), un doble enlace exocíclico sirve de unión entre los fragmentos A con B, mediante correlaciones a larga distancia entre H-10 (δ 4.34) con C-11 (δ 151.3) y entre H-19 (δ 4.95, 5.06) con C-11a (δ 41.7) y C-10 (δ 80.2).

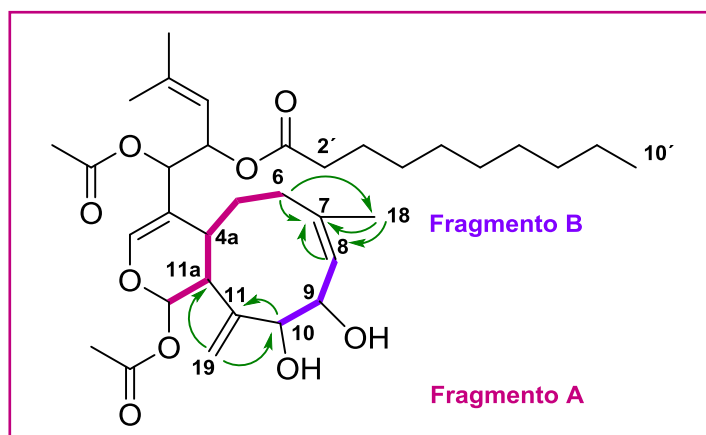


Figura 92. Unión de los fragmentos B y C mediante las correlaciones HMBC observadas.

De esta forma se obtiene la estructura plana de protoxicenina B (**4**) y además se justifica la fórmula molecular y los nueve grados de insaturación.

4.2.4.4 Determinación de la configuración relativa de la protoxenicin B (4).

La configuración relativa de **4** se llevó a cabo de manera similar que para la protoxenicina A (**3**). La configuración relativa $1R^*$, $4aS^*$ y $11aR^*$ del anillo de 1-acetoxidihidropirano se dedujo por comparación de sus datos espectroscópicos de RMN con los de protoxenicina A (**3**) y antheliatin.⁵⁸ La fusión de los dos anillos es *trans* y se asume que esta unión es idéntica a la que presentan todos los compuestos de la familia de los xenicinas descritos. Esta fusión *trans* se confirmó por las correlaciones observadas en el experimento ROESY entre H-11a con H-5 β (δ_H 1.73) y con H-6 β (δ_H 2.50), entre H-4a con H-5 α (δ_H 2.04) y H-6 α (δ_H 2.23), indicando que H-11a está situado en la cara superior del plano β y que H-4a se encuentra en la cara inferior α .

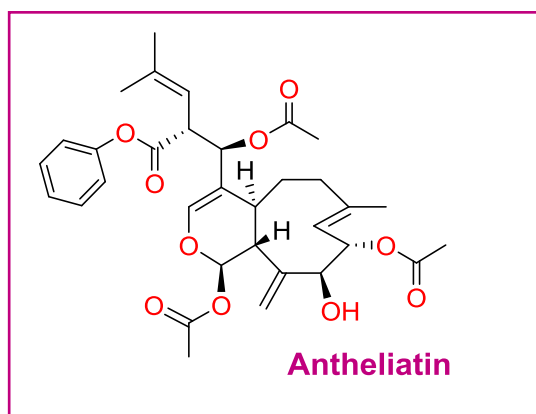


Figura 93. Estructura de antheliatin

La configuración relativa de los centros estereogénicos del fragmento C en **4** se dedujo por comparación con la del compuesto **3**. La constante de acoplamiento grande ($J_{H12, H13}$ de 6.2 Hz) entre H-12 y H-13 en el espectro de RMN 1H de **4** reveló la disposición antiperiplanar de estos protones. Los valores similares de las constantes de acoplamiento de estas posiciones en los compuestos **3** y **4**, sugirieron la configuración relativa $12R^*$ y $13S^*$. Además, los desplazamientos químicos de carbono del compuesto **4** de C-

⁵⁸ Rudi, A.; Golberg, I.; Stein, Z.; Kashman, Y. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1581–1586.

12 (δ_{C12} 74,9) y C-13 (δ_{C13} 70,7) son similares a los encontrados en havannahine (δ_{C12} 75.1 y δ_{C13} 69.6)⁵⁹ y havannachlorhydrins (δ_{C12} 76.4 y δ_{C13} 71.0)⁶⁰ aislado de *Xenia membranacea*, que posee la misma configuración relativa 12*R** y 13*S**. Por el contrario, antheliatin (δ_{C12} 71.6 y δ_{C13} 71.9),⁶¹ florxenilido (δ_{C12} 70.6 y δ_{C13} 71.5)⁶² y un xenicano aislado del coral *Clavularia inflate* var. *luzoniana* (δ_{C12} 71.6 y δ_{C13} 70.7),⁶³ presentan la configuración relativa opuesta 12*S**, 13*R**.

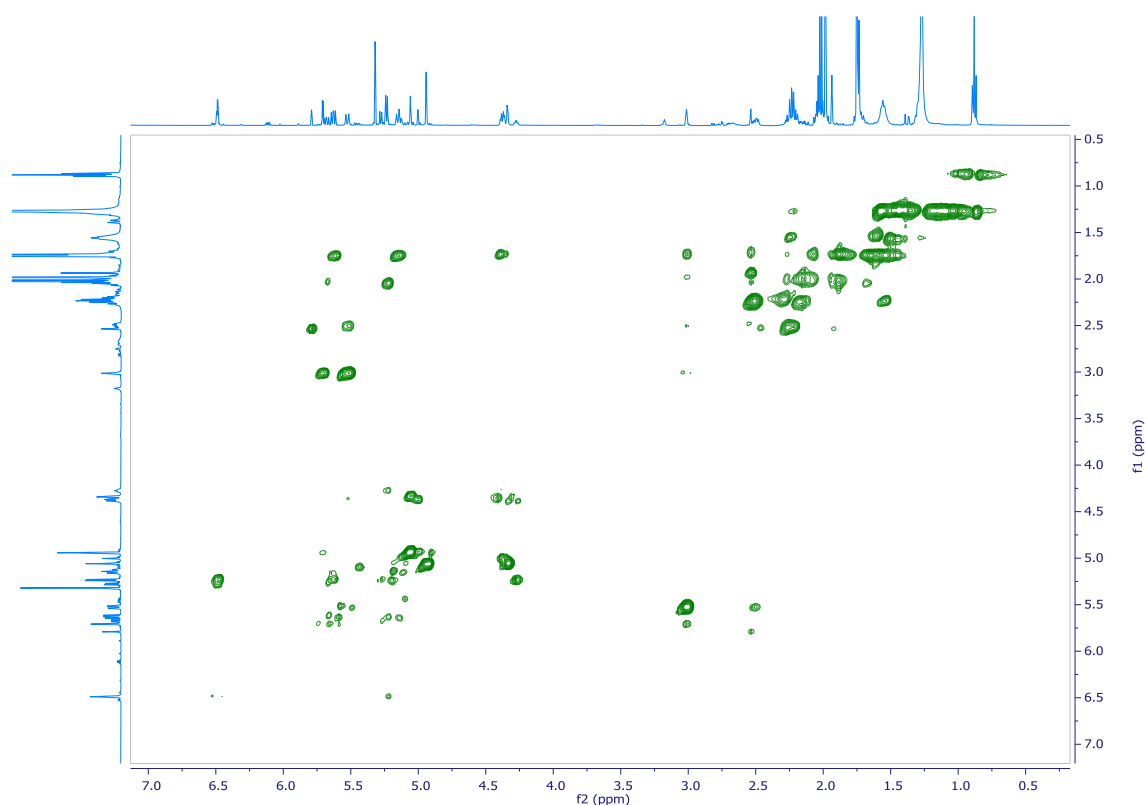


Figura 94. Espectro ROESY (500 MHz, CD₂Cl₂) de protoxenicin B (4).

⁵⁹ Lelong, H.; Ahond, A.; Chiaroni, A.; Poupat, C.; Riche, C.; Potier, P.; Pusset, J.; Pusset, M.; Laboute, P.; Menou, J. L. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 203–2010.

⁶⁰ Almourabit, A.; Ahond, A.; Chiaroni, A.; Poupat, C.; Riche, C.; Potier, P.; Laboute, P.; Menou, J. L. *J. Nat. Prod.* **1987**, *51*, 282–292.

⁶¹ Rudi, A.; Golberg, I.; Stein, Z.; Kashman, Y. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1581–1586.

⁶² Cheng, Y.; Jang, J.; Khalil, A. T.; Kuo, Y.; Shen, Y.; Two, A. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 675–678.

⁶³ Wang, S.-K.; Huang, M.-J.; Duh, C.-Y. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1411–1416.

Finalmente, con el fin de determinar las configuraciones relativas del 1,2-diol (C-9 y C-10), se preparó el acetónido correspondiente⁶⁴ y se llevó a cabo un estudio en detalle de los desplazamientos químicos de los grupos metilos del acetónido.

Para la formación del acetónido se disolvió la protoxicina B (**4**) con acetona anhidra y se añadió 2-metoxipropano y ácido camforsulfónico. Se realizó un espectro de RMN ^1H (en CD_2Cl_2 y en C_6D_6) al crudo, y sorprendentemente, se observaron las señales de un único compuesto en lugar de los dos componentes del producto de partida (Figura 95). Por dicho motivo, se decidió realizar un profundo de los espectros de RMN obtenidos.

El análisis de la combinación de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C en dos disolventes deuterados (CD_2Cl_2 y C_6D_6) (Tabla 14), junto con los experimentos HSQC-editado (Figura 99, Figura 100) y HMBC (Figura 103, Figura 104) de ambos, permitió identificar las señales pertenecientes al acetónido (**4a**). Se centró el estudio en los desplazamientos químicos en C_6D_6 de los protones oxigenados H-9 (δ_{H} 4.75) y H-10 (δ_{H} 4.48).

La configuración *E* del doble enlace entre las posiciones 7 y 8 se determinó por la correlación NOE intensa observada en el experimento ROESY (Figura 105, Figura 106) entre H-8 (δ_{H} 5.01) y H-4a (δ_{H} 2.36) y que se confirmó por la ausencia de correlación NOE entre H-8 (δ_{H} 5.01) y H-18 (δ_{H} 2.10). Las correlaciones NOE observadas desde H-10 (δ_{H} 4.48) a H-8 (δ_{H} 5.01), H-9 (δ_{H} 4.75) y H-19a (δ_{H} 5.06), junto con las correlaciones NOE de H-8 (δ_{H} 5.01) con H-9 (δ_{H} 4.75) y de H-19a (δ_{H} 5.06) con H-19b (δ_{H} 4.95), y de estos últimos con H-4a (δ_{H} 2.36), nos permiten localizar a todos esos protones

⁶⁴ Rianto, A. T.; Ermawan, I. H.; Oogd, J. D. E. V; Anaka, J. T. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo). **2011**, *59*, 1311–1313.

en la misma cara de la molécula, asignada de manera arbitraria como α . Por otro lado, las correlaciones NOE observadas entre H-11a (δ_{H} 2.72) y los protones de los metilos del grupo acetónido a 1.53 ppm, localizan estos protones en el otro lado de la molécula asignada como β .

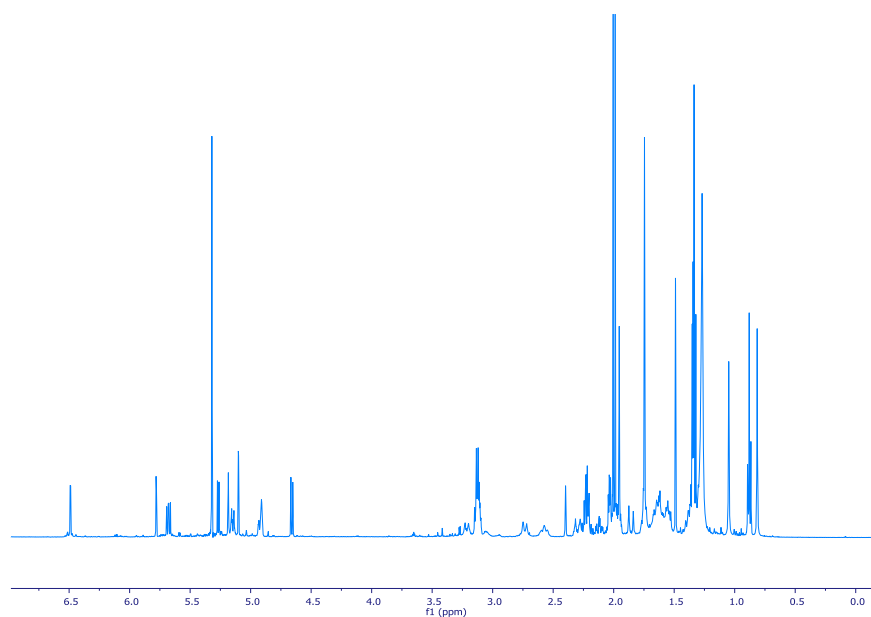


Figura 95. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_2Cl_2) del derivado acetónido de protoxenicina B (**4a**).

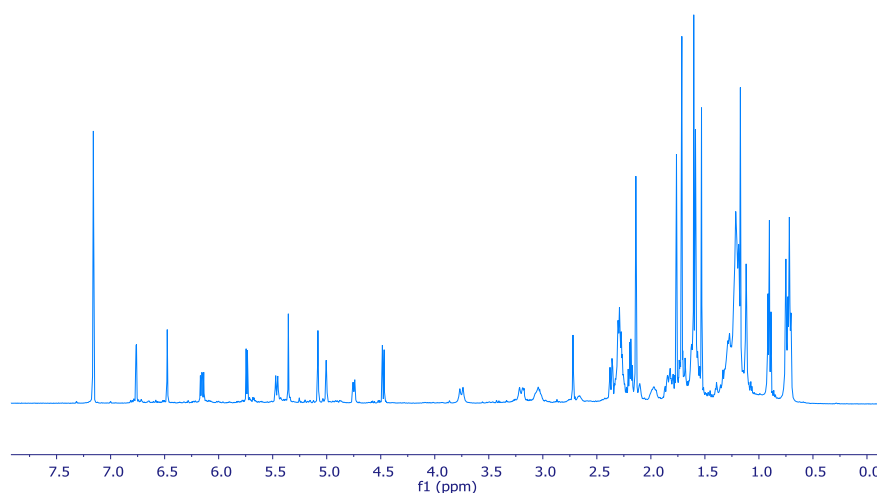
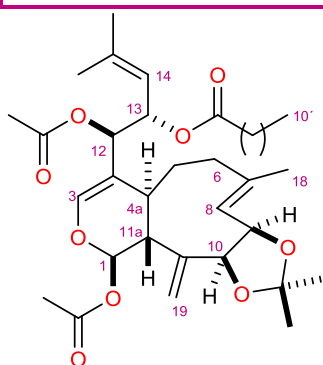


Figura 96. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, C_6D_6) del derivado acetónido de protoxenicina B (**4a**).

Tabla 11. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C (500 MHz, C_6D_6 y CD_2Cl_2) del derivado acetónido de protoxicina B (**4a**).

Pos.	Protoxicina B-acetonido (C_6D_6)		Protoxicina B-acetonido (CD_2Cl_2)	
	δ_{C} , mult	δ_{H} mult. (J in Hz)	δ_{C} , mult	δ_{H} mult. (J in Hz)
1	92.1 CH	6.48 d (1.3)	91.9 CH	5.78 d (1.4)
3	143.0 CH	6.70 d (2.1)	142.7 CH	6.49 d (2.2)
4	114.5 qC		114.4 qC	
4a	40.8 CH	2.36 bs	40.5 CH	2.04 m
5	29.1 CH_2	1.85 m, 2.29 m	29.0 CH_2	1.65 m, 1.97 m
6	43.9 CH_2	2.26 m, 2.37 m	44.0 CH_2	2.14 m, 2.23 m
7	139.9 qC		137.3 qC	
8	121.0 CH	5.01, d (2.6)	120.7 CH	5.01, d (2.6)
9	78.3 CH	4.75 dd (7.9, 2.6)	78.3 CH	4.93 bs
10	84.6 CH	4.48, d (7.9)	84.8 CH	4.66 d (7.7)
11	149.8 qC		149.7 qC	
11a	42.6 CH	2.72 dd (1.3)	42.3 CH	2.39 bs
12	75.7 CH	5.74 d (6.0)	75.5 CH	5.29 d (6.4)
13	70.6 CH	6.15 dd (9.4, 6.0)	70.6 CH	5.70 dd (9.2, 6.4)
14	120.3 CH	5.14 dd (9.4, 1.2)	120.1 CH	5.14 m
15	139.9 qC		140.3 qC	
16	25.9 CH_3	1.58 s	26.3 CH_3	1.75 s
17	18.8 CH_3	1.76 s	19.0 CH_3	1.75 s
18	18.6 CH_3	2.10 s	21.4 CH_3	1.98 s
19	118.5 CH_2	5.08 s, 5.36 s	118.9 CH_2	5.12 s, 5.21 s
1'	172.5 qC	.	173.1 qC	.
2'	34.6 CH_2	2.20 m	35.0 CH_2	2.24 m
3'	25.2 CH_2	1.57 m	25.6 CH_2	1.57 m
4'-9'	29.4-29.8 CH_2	1.22 m	29.7-30.0 CH_2	1.29 m
10'	14.4 CH_3	0.90 t (7.0)	14.4 CH_3	0.90 t (7.0)
OAc-1	169.2 qC		169.5 qC	
	20.3 CH_3	1.61 s	21.2 CH_3	2.00 s
OAc-12	169.5 qC		170.2 qC	
	20.8 CH_3	1.71 s	21.4 CH_3	1.98 s
C acetónido	109.5		109.8	
CH_3 (1) acetónido	23.1	1.17 s	23.5	1.36 s
CH_3 (2) acetónido	25.8	1.53 s	26	1.51 s



Acetónido de protoxicina B

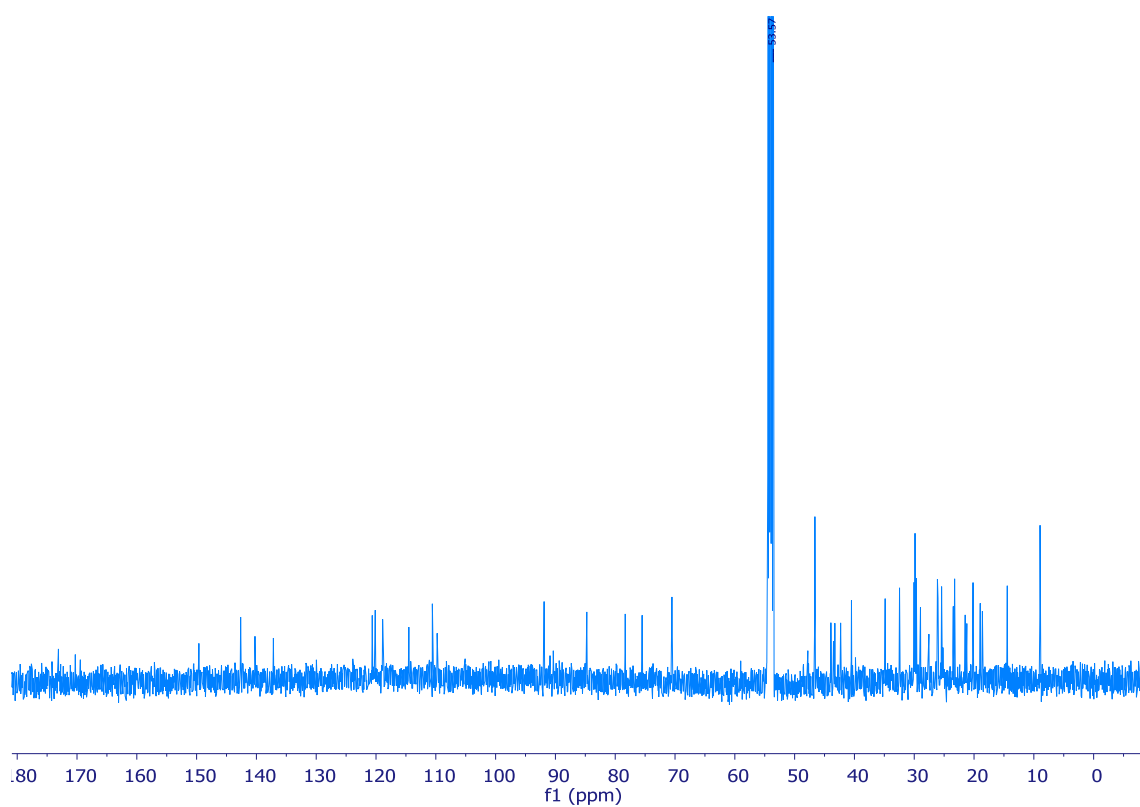


Figura 97. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_2Cl_2) del derivado acetónido de protoxenicina B (**4a**).

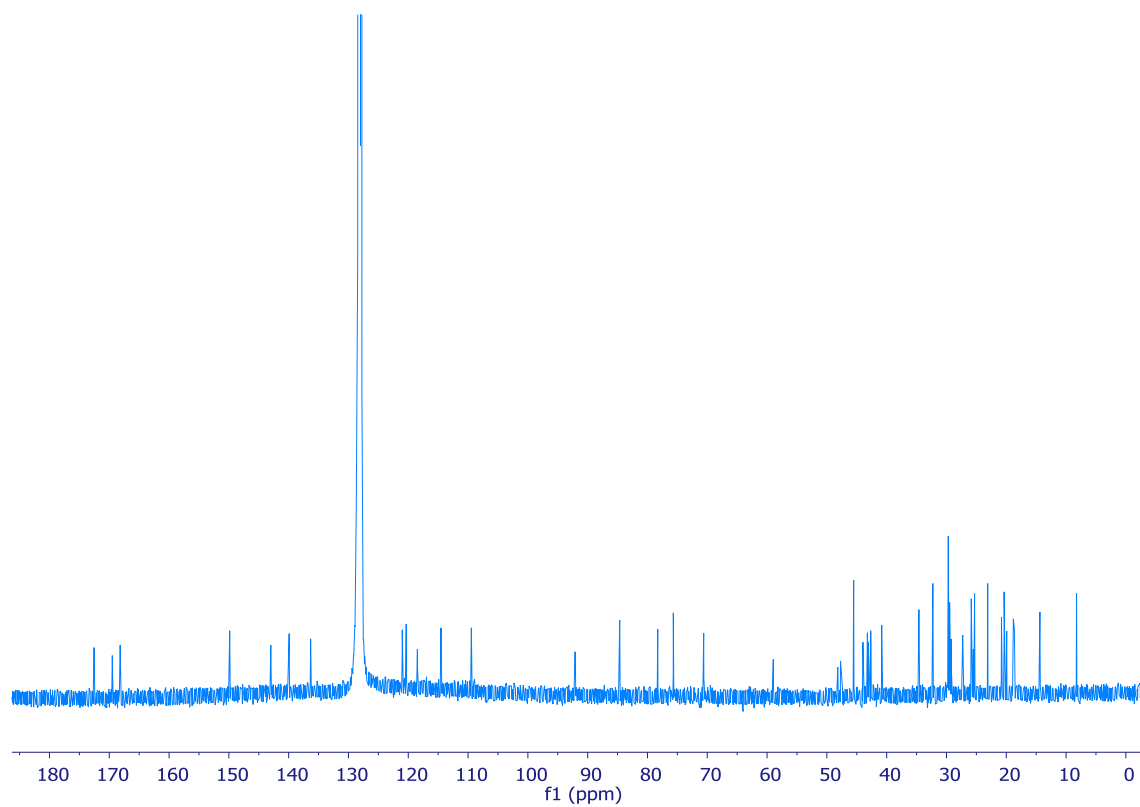


Figura 98. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, C_6D_6) del derivado acetónido de protoxenicina B (**4a**).

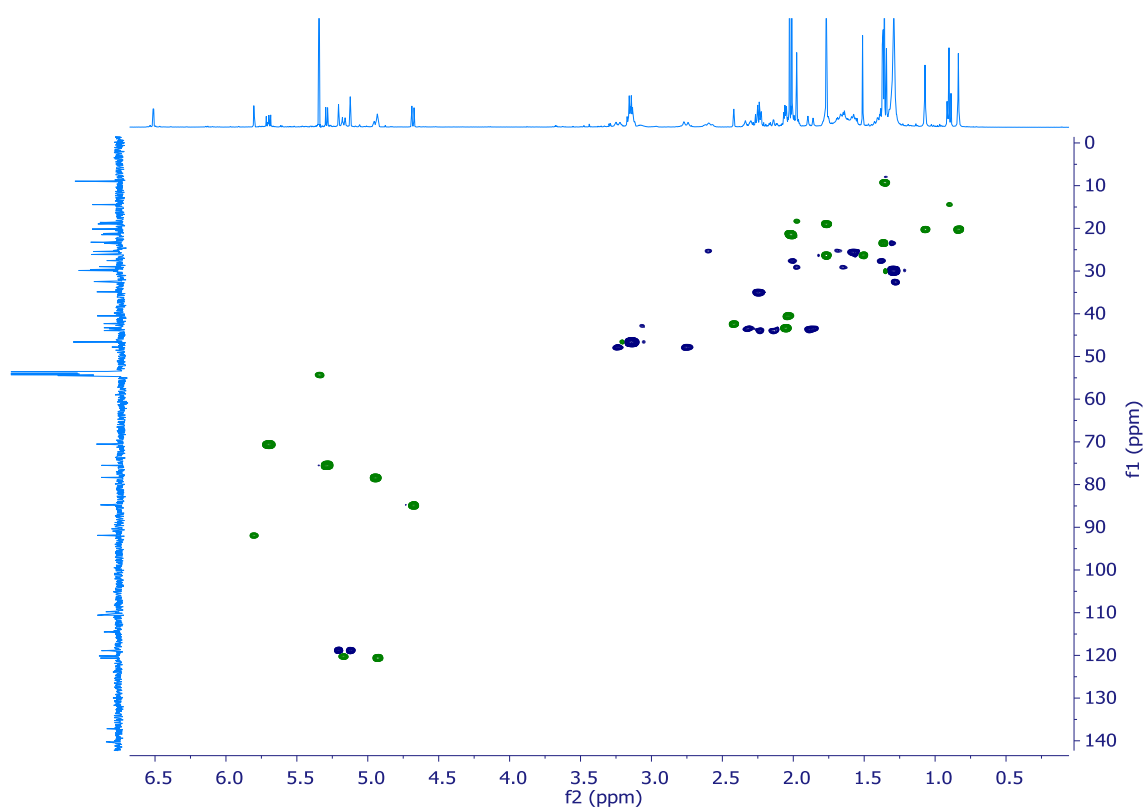


Figura 99. Espectro HSQC (500 MHz, CD₂Cl₂) del derivado acetónido de protoxenicina B (**4a**).

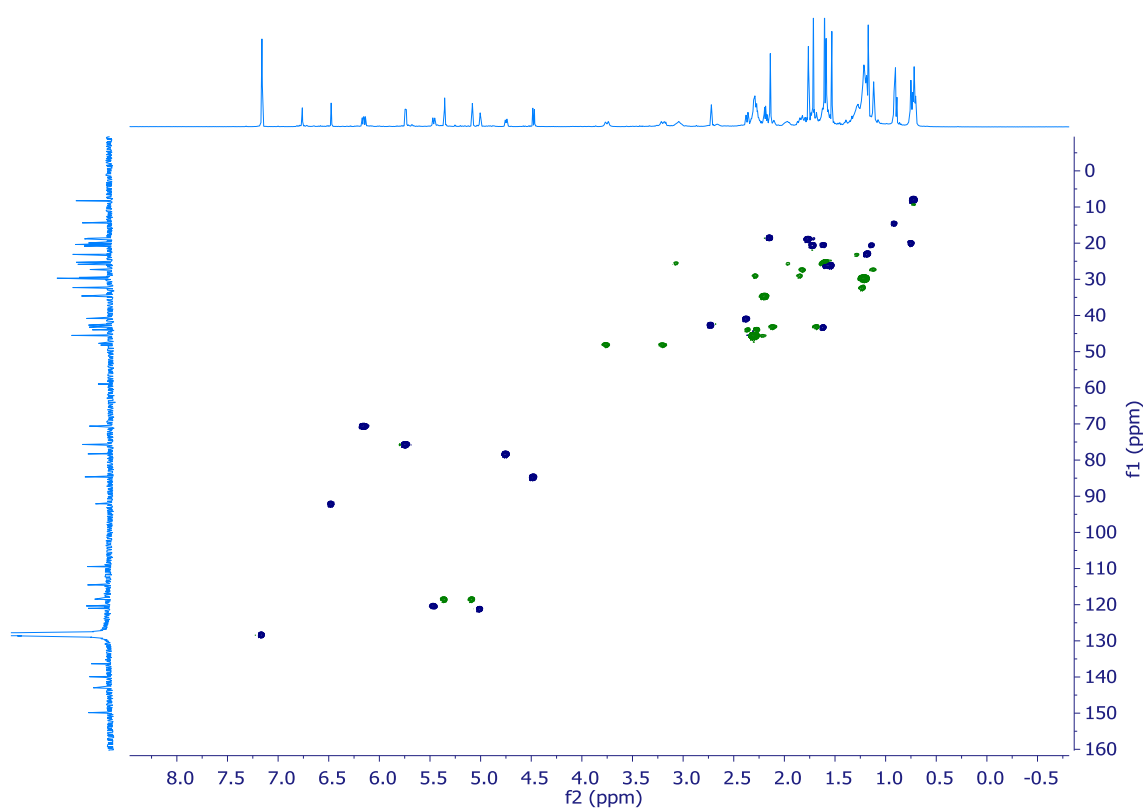


Figura 100. Espectro HSQC (500 MHz, C₆D₆) del derivado acetónido de protoxenicina B (**4a**).

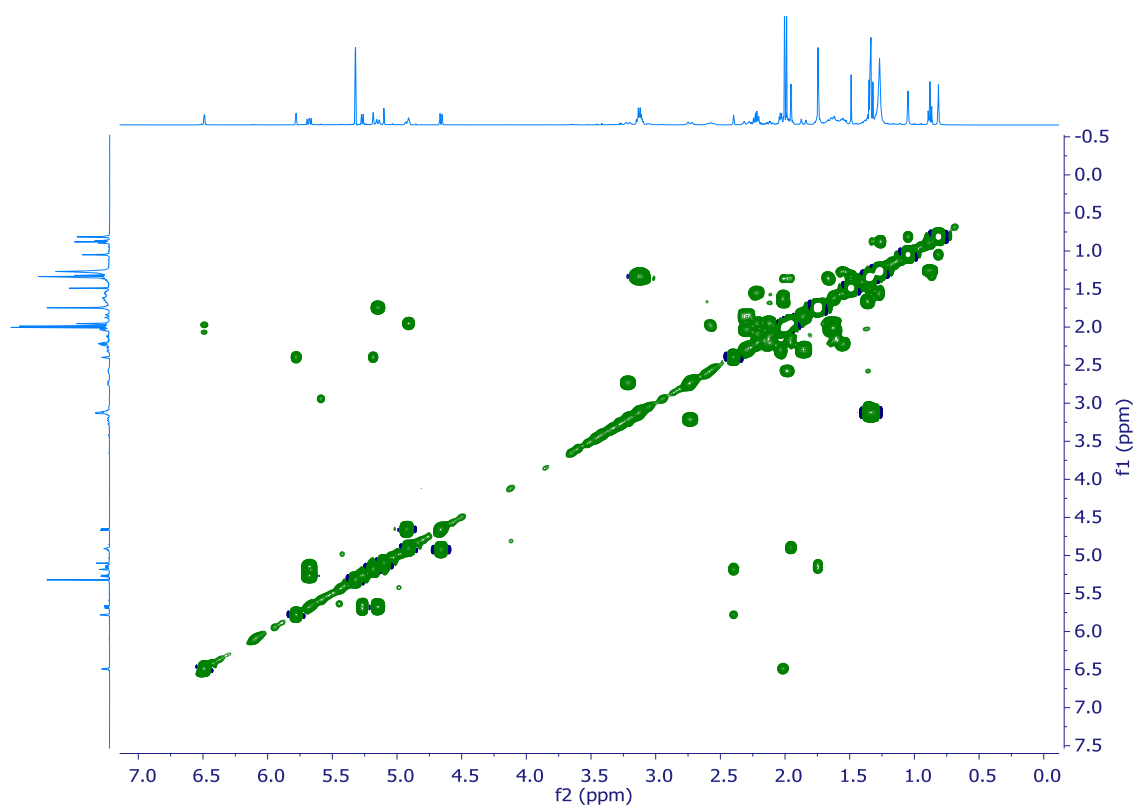


Figura 101. Espectro COSY (500 MHz, CD_2Cl_2) del derivado acetónido de protoxenicina B (4a).

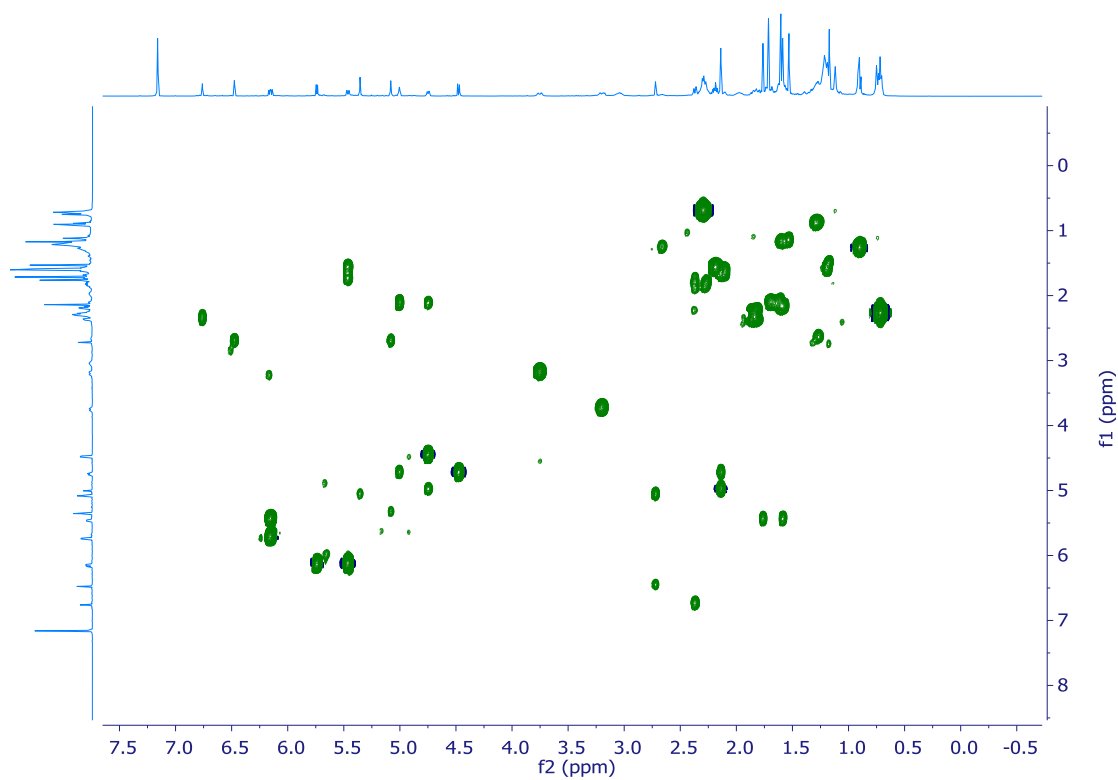


Figura 102. Espectro COSY (500 MHz, C_6D_6) del derivado acetónido de protoxenicina B (4a).

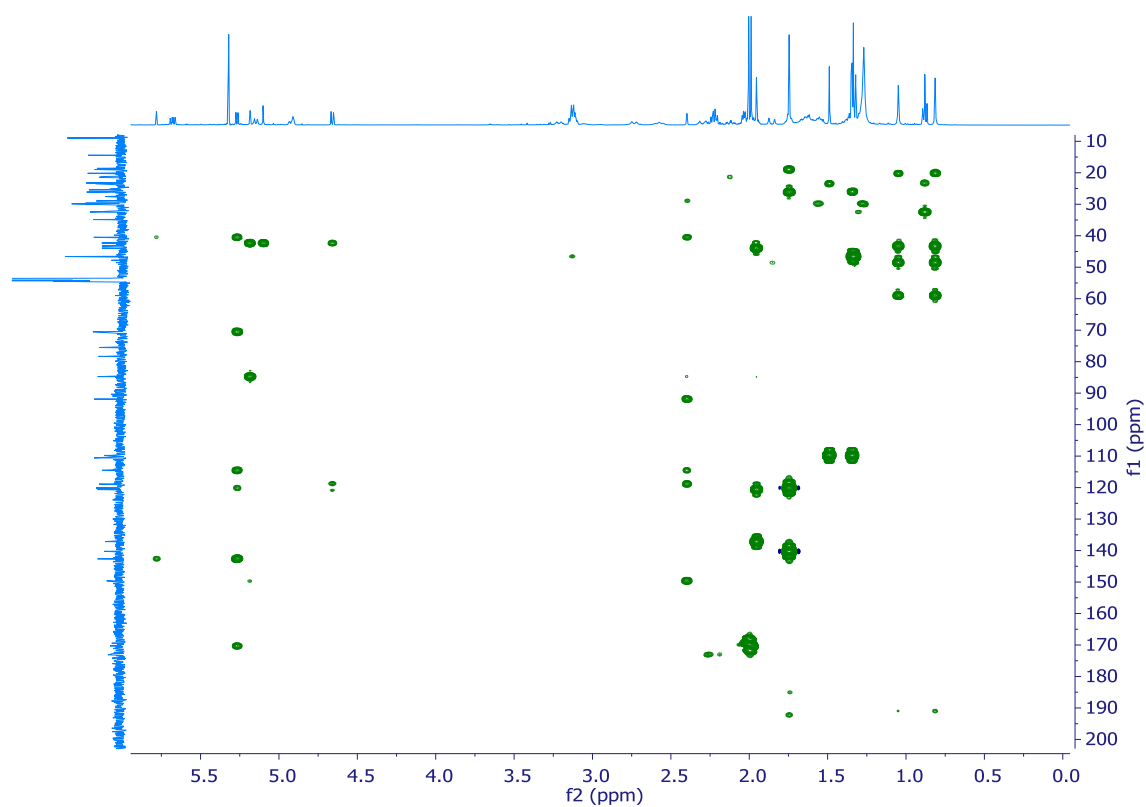


Figura 103. Espectro HMBC (500 MHz, CD₂Cl₂) del derivado acetónido de protoxenicina B (4a).

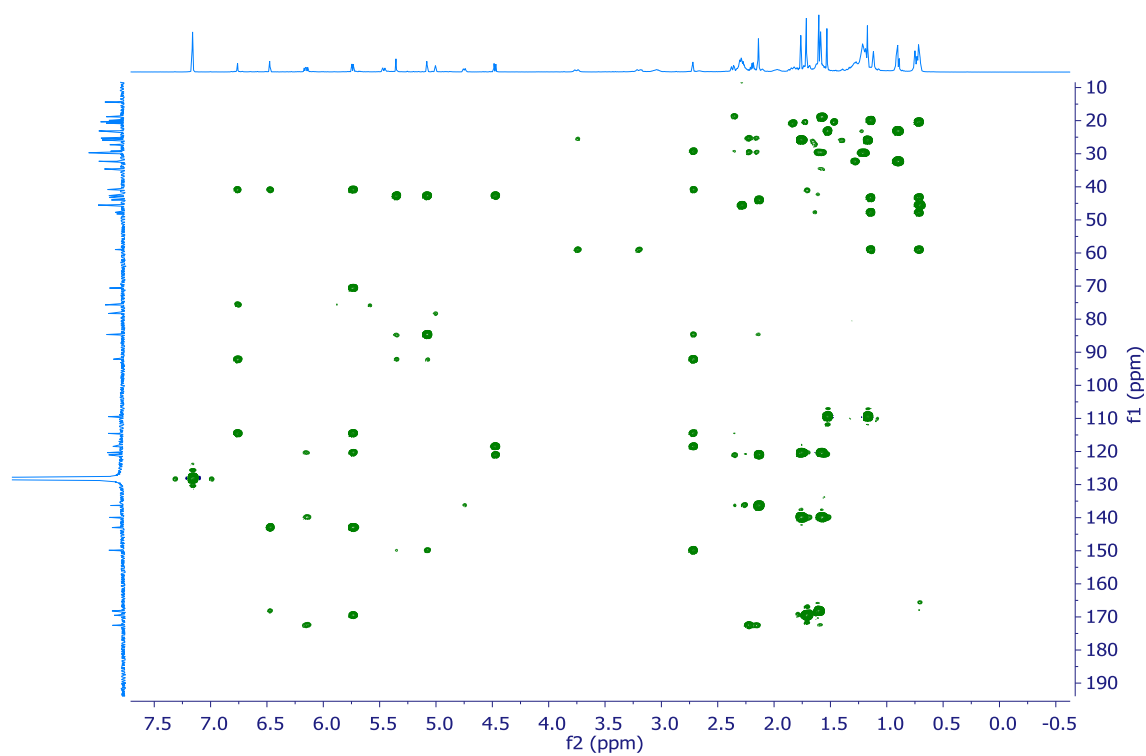


Figura 104. Espectro HMBC (500 MHz, C₆D₆) del derivado acetónido de protoxenicina B (4a).

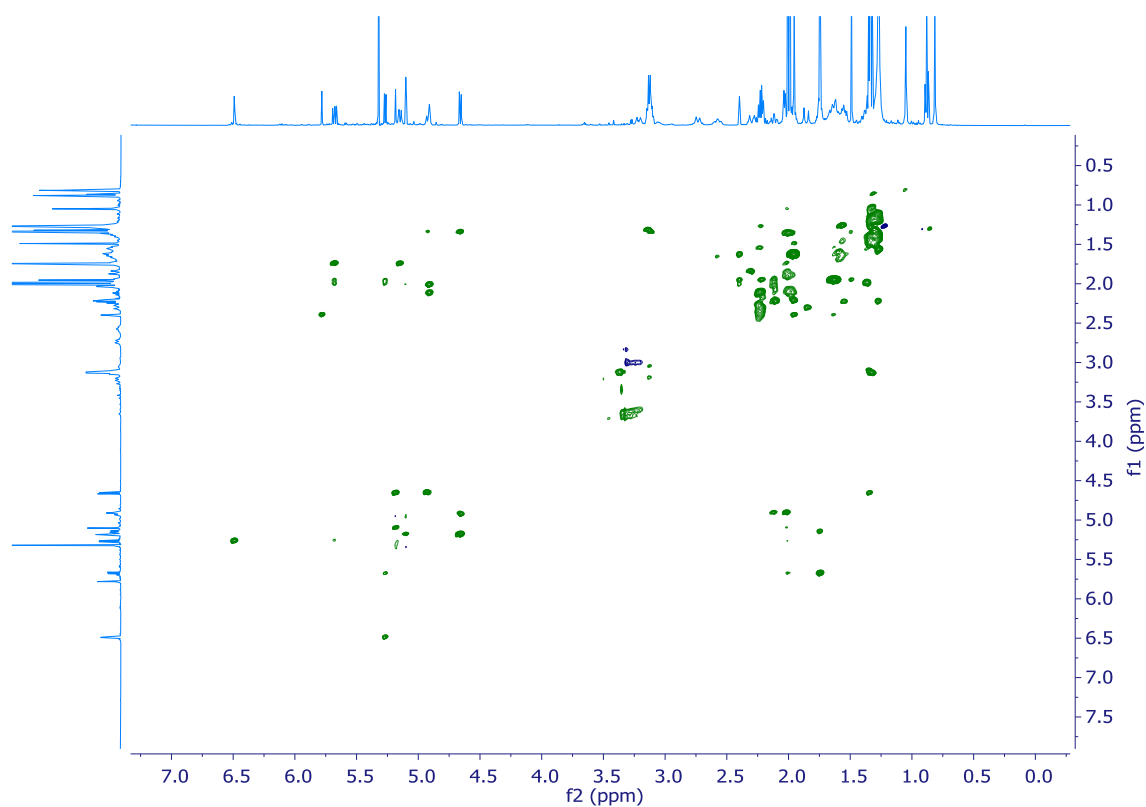


Figura 105. Espectro ROESY (500 MHz, CD₂Cl₂) del derivado acetónido de protoxenicina B (4a).

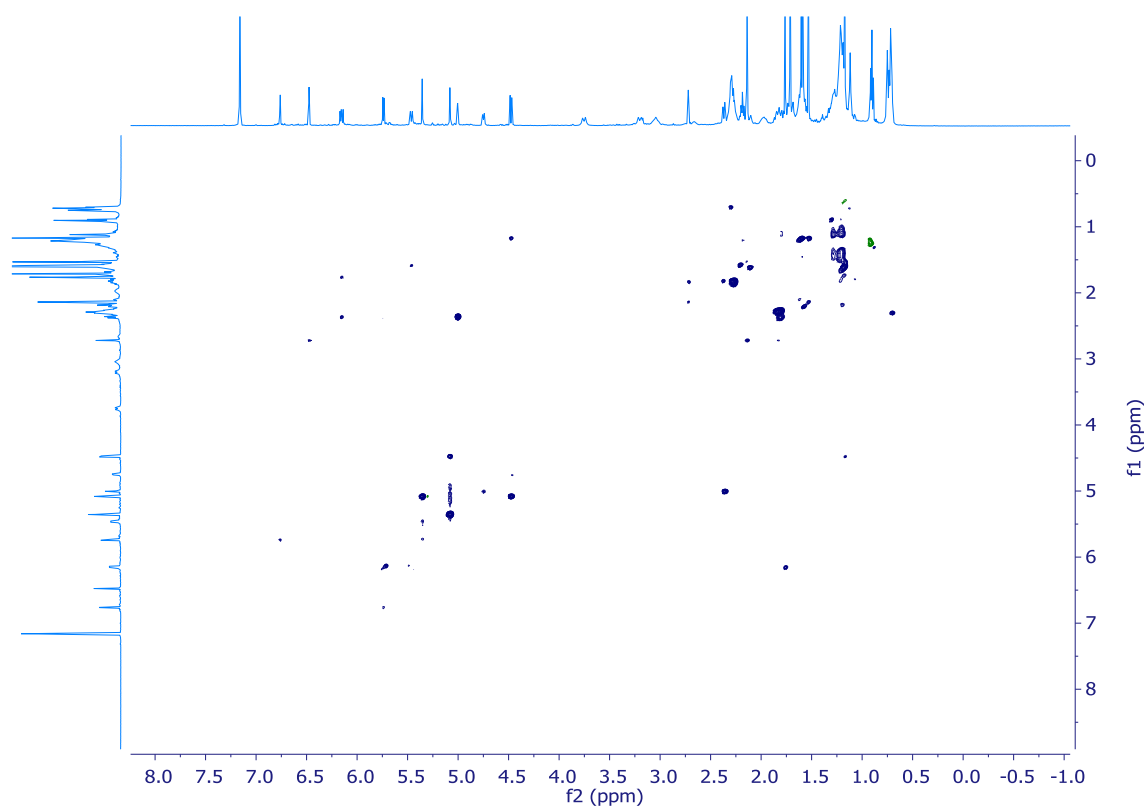


Figura 106. Espectro ROESY (500 MHz, C₆D₆) del derivado acetónido de protoxenicina B (4a).

En el experimento HSQC-editado de **4a** en CD_2Cl_2 (Figura 107) aparece una señal a 109.8 ppm que corresponde a un carbono no protonado que no estaba presente en el espectro de RMN ^{13}C de protoxenicin B (**4**). Las correlaciones a larga distancia observadas desde ese carbono a dos metilos singuletes a 1.36 y 1.51 ppm permite identificar los tres carbonos pertenecientes al acetónido.

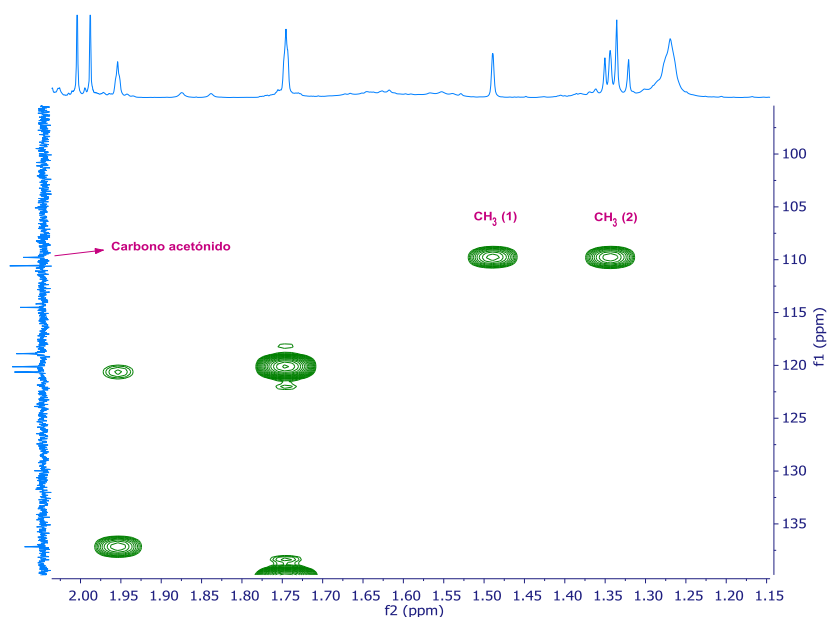


Figura 107. Ampliación del Espectro HSQC (500 MHz, CD_2Cl_2) del derivado acetónido de protoxenicin B (**4a**).

Una vez confirmada la formación del acetónido, se analizó las correlaciones observadas en el experimento ROESY (Figura 108) sobre los protones oxigenados H-9 (δ 4.94) y H-10 (δ 4.66) que soportan el acetónido. En nuestro caso se observó una correlación NOE entre H-9 y H-10, confirmando la disposición *sin* del acetónido y, por consiguiente, la presencia de un acetónido *sin*-1,2-diol

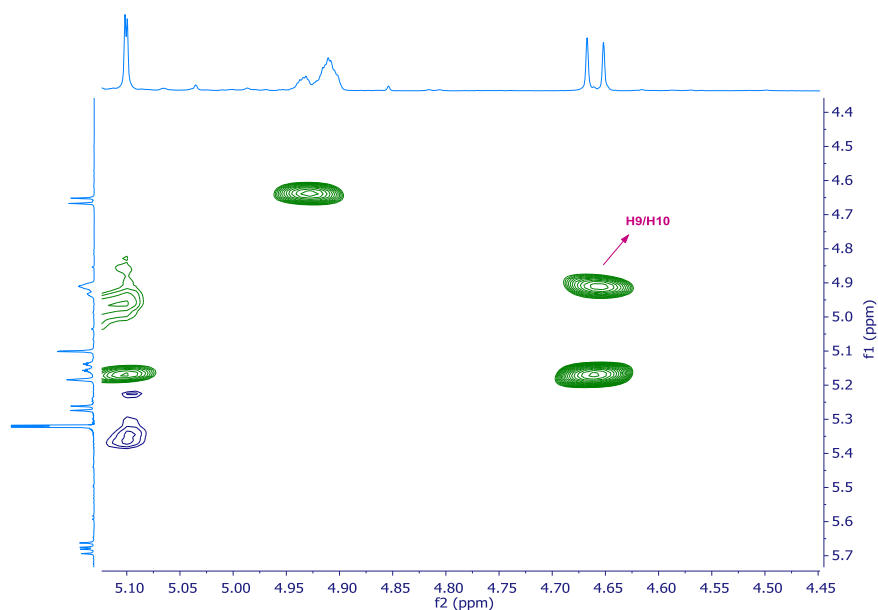


Figura 108. Ampliación del espectro ROESY (500 MHz, CD_2Cl_2) del derivado acetónido de protoxenicina B (**4a**).

Como en el caso de **3**, a partir del acetónido se obtuvo un conformero de mínima energía a partir de una búsqueda conformacional usando el programa Macromode con el módulo Monte Carlo que explica las correlaciones NOE observadas en el espectro ROESY de **4b** (Figura 109), que da como resultado una configuración relativa del acetónido de la protoxenicin B (**4b**) de $1R^*$, $4aS^*$, $9R^*$, $10S^*$, $11aR^*$, $12R^*$ y $13S^*$.

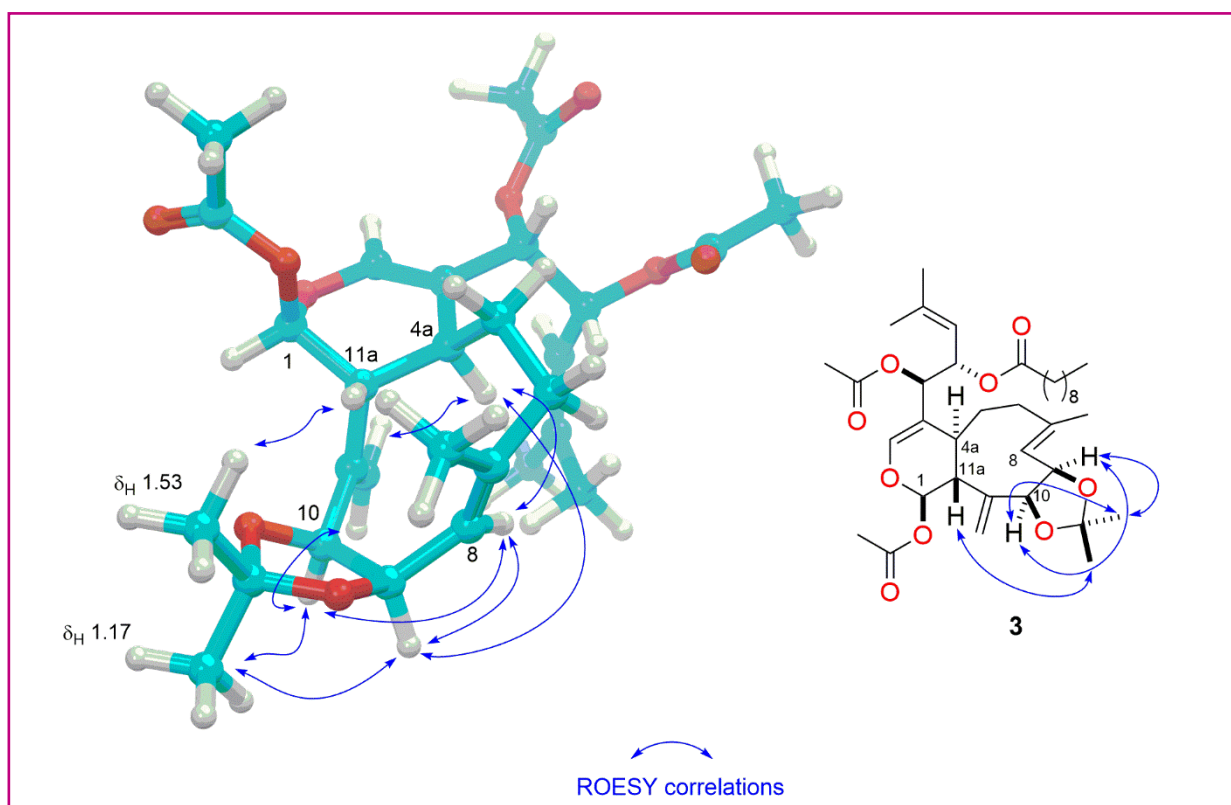


Figura 109. Correlaciones NOE sobre conformero más estable encontrado en la búsqueda conformacional de **4b**.

Estos resultados permiten proponer que la protoxenecina B (**4**) se encuentra presente en solución como una mezcla de dos conformeros. Desafortunadamente, no se disponía de más muestra de **4** para repetir los espectros de RMN a alta o baja temperatura y para poder demostrar así la existencia de un equilibrio conformacional. Aunque la estructura tridimensional de cada posible conformero no se pudo establecer, la comparación de las constantes de acoplamiento y los desplazamientos químicos de **4** (Tabla 12, Figura 110) para cada uno de los dos conformeros mostraron que las principales diferencias estaban localizadas alrededor de las posiciones C-1/C-4a/C-8/C-9/C-10/C-11a.

Tabla 12. Principales diferencias en los desplazamiento químicos y constantes de acoplamiento detectados entre los dos pares de señales observadas en el espectro de ^1H RMN de **4** en CD_2Cl_2 .

Componente mayoritario		Componente minoritario	
Posición	δ_{H} , mult. (J in Hz)	Position	δ_{H} , mult. (J in Hz)
1	5.71, d (5.7)	1	5.79, d (1.0)
4a	1.99, m	4a	2.04, m
8	5.53, d (10.8)	8	5.28, d (6.2)
9	4.39, dd (10.2, 3.7)	9	4.27, dd (6.2, 6.2)
10	4.34, d (3.7)	10	4.37, d (6.2)
11a	3.01, bs	11a	2.54, bs

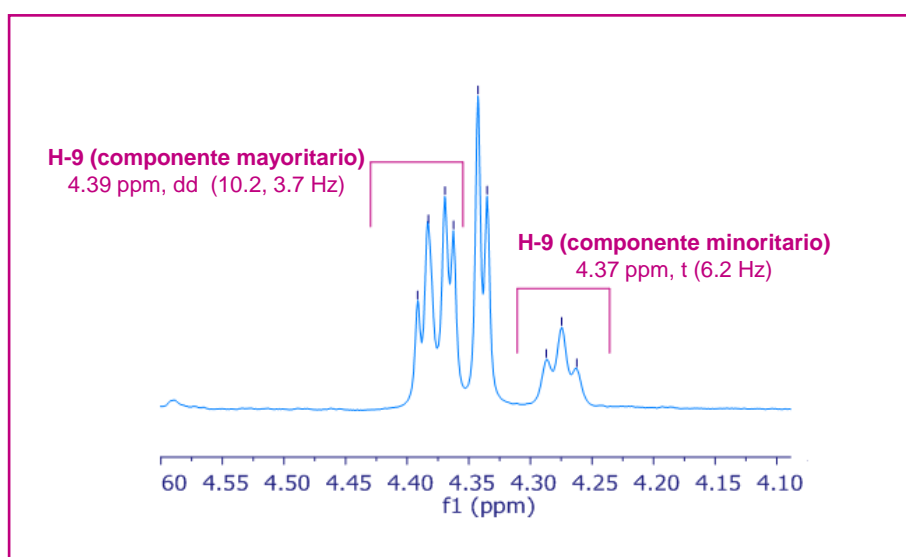


Figura 110. Diferencias en el desplazamiento de H-9 en el componente mayoritario y minoritario de protoxencin B (**4**)

4.2.5 Actividad citotóxica de protoxenicin A (3) y protoxenicin B (4)

Se evaluó la actividad citotóxica de los compuestos **3** y **4** frente a distintos tipos de células tumorales humanas: mama (MDA-MB-231), colon (HT-29) y pulmón (NSLC A-549). Ambos compuestos mostraron fuerte actividad citotóxica frente a las células de colón.

Tabla 13 . Datos de la actividad citotóxica (μM) de protoxenicin A (**3**) y protoxenicin B (**4**) y doxorubicin.

Compuesto		Línea células tumorales		
		Mama	Colon	Pulmón
		MDA-MB-231	HT-29	NSLC A-549
Protoxenicin A (3)	GI ₅₀	2.1	0.6	1.1
	TGI	2.8	1.2	1.4
	LC ₅₀	3.8	2.1	1.9
Protoxenicin B (4)	GI ₅₀	6.3	1.7	6.1
	TGI	9.7	5.2	10.0
	LC ₅₀	13.0	1.0	13.0
Doxorubicin	GI ₅₀	0.15	0.27	0.21
	TGI	0.50	0.86	0.85
	LC ₅₀	2.41	>17.2	>17.2

4.3 Conclusiones

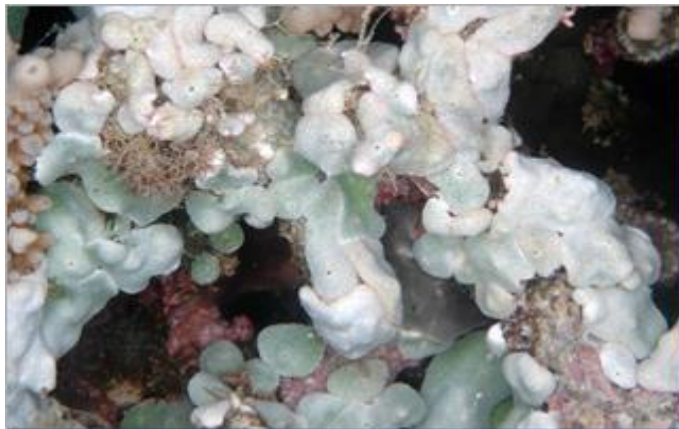
Se realizó el primer estudio químico del coral blando *Protodendron repens* que permitió aislar e identificar dos nuevos xenicanos cuya novedad estructural es la presencia de una cadena larga de ácidos grasos. La presencia de esta cadena larga puede mejorar las propiedades físicas de estos compuestos. Se determinó la configuración absoluta de protoxenicina A (**3**) mediante aplicación del método de Mosher, y además,

se propone que protoxenicina B (**4**) se encuentra en disolución como mezcla de conformeros 2:1

Finalmente, estos compuestos mostraron actividad citotóxica contra tres líneas tumorales humanas.

Los resultados de este estudio dieron lugar a la publicación “Protoxenicans A and B, Cytotoxic Long-Chain Acylated Xenicanes from the Soft Coral *Protodendron repens*”.⁶⁵

⁶⁵ Urda, C.; Fernández, R.; Pérez, M.; Rodríguez, J.; Jiménez, C.; Cuevas, C. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 713–719.



Capítulo 5: Estudio químico
del tunicado *Lissoclinum*
bistratum.

Capítulo 5: ESTUDIO QUÍMICO DEL TUNICADO *Lissoclinum bistratum*.

5.1 Antecedentes

Los tunicados de la especie *Lissoclinum bistratum* son vertebrados pertenecientes al filo Chordata, subfilo Tunicata, clase Ascidiacea, orden aplousobranchia y Familia Didemnidae.⁶⁶

Filo	Subfilo	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
<u>Chordata</u>	Cephalochordata <u>Tunicata</u> Vertebrata	Appendicularia <u>Ascidiacea</u> Sorberacea Tiacea	<u>Aplousobranchia</u> Phlebobranchia Stolidobranchia Enterogona Pleurogona	Clavelinidae <u>Didemnidae</u> Euhdermaniidae Holozoidae Placentelidae Polycitoridae Polyclinidae Protopolyclinidae Pseudodistomidae Ritterellidae Stomozoidae Vitrumidae	Atrialum Clitella Coelocormus Didemnum Diplosoma Leptoclinides <u>Lissoclinum</u> Polysyncraton Trididemnum Arenadiplosoma Askonides Astellium Didemnum Didemnoides Didemnopsis Diplosomoides Echinoclinum Hypurgon Leptoclinum Lioclinum Polysoma Pseudodidemnum Pseudodiplosoma Sarcodidemnoides Tetradidemnum Tridentemnum	abdominale agriculum argyllense aureum badium bilobatum bistratum branchiatus caliginosum calycis capense caulleryi cavum clavatum coactum conchylum cornutum diversum durabile fragile japonicum karenae triforme laneum levitum limosum maculatum marpum mereti midui nebulosum
						notti ostrearium pacificense patella perforatum polyorchis punctatum ravarava reginum roseum rubrum scopulosum sente spongium stellatum taratara tasmanense textile textrinum timorense triangulum tuheiaevae tunicatum vareau variabile verrilli vulgare wandeli weigelei multitestis

Figura 111. Clasificación taxonómica del género *Lissoclinum*.

Se trata de un tunicado colonial complejo, en donde los zooides se encuentran envueltos por una túnica común. Las colonias por lo general son pequeñas, formando unos cojines ovales de unos 2 cm, aunque a veces forman capas algo más grandes, llegando hasta los 5 cm. En cualquier caso,

⁶⁶ World Register of Marine Species (www.marinespecies.org)

las colonias no alcanzan más de 5 milímetros de espesor. Aparecen una o más cloacas comunes a la colonia que se presentan en pequeñas elevaciones cilíndricas a veces dobladas en el sentido de la corriente predominante. Las espículas de 0.05 mm de diámetro siempre son esféricas con los radios terminados en cilindros planos y se sitúan en la base y alrededor de los márgenes de la colonia y rodeando las aberturas branquiales.

El color de las colonias pueden variar desde el amarillo o rosado hasta el blanco o el verde cuando la intensidad de la luz es reducida. Esta especie es de especial interés en relación con el control de la luz que incide sobre sus simbiontes *Prochloron*, alterando el ratio de la clorofila a y b de los simbiontes.

Estos tunicados han sido ampliamente estudiadas a lo largo de estos últimos años, aislándose compuestos de diferente naturaleza química, algunos de los cuales presentan interesantes actividades biológicas.

Dentro del género *Lissoclinum* existen 57 especies (ver tabla 2). Las ascidias del género *Lissoclinum* se caracterizan por la producción de ciclopéptidos, muchos de los cuáles presentan aminoácidos modificados que cuentan con anillos de tiazol, oxazol, tiazolina u oxazolina. Estos heterociclos se forman como producto de condensación del grupo OH de la treonina o del grupo SH de la cisteína con el grupo carbonilo del enlace peptídico precedente.

Dado que estructuras similares han sido descubiertas a partir de cianobacterias, se planteó la hipótesis de que los péptidos producidos por el género *Lissoclinum* debían de proceder de las correspondientes de cianobacterias simbiontes. Las ascidias albergan un simbionte obligado, el *Prochloron* sp., el cual, se piensa que está involucrado en la biosíntesis de los

ciclopéptidos como metabolitos secundarios debido a que *Prochloron* es un importante nutriente para su huésped.^{67,68,69,70}

En 1994 se reportó el aislamiento de cuatro poliéteres cíclicos llamados bistramidas A, B, C y K.⁷¹ Presentan actividad citotóxica frente a cinco líneas celulares tumorales: KB, P388, P388/dox. (doxorubicin-resistente), B 16 y HT29.

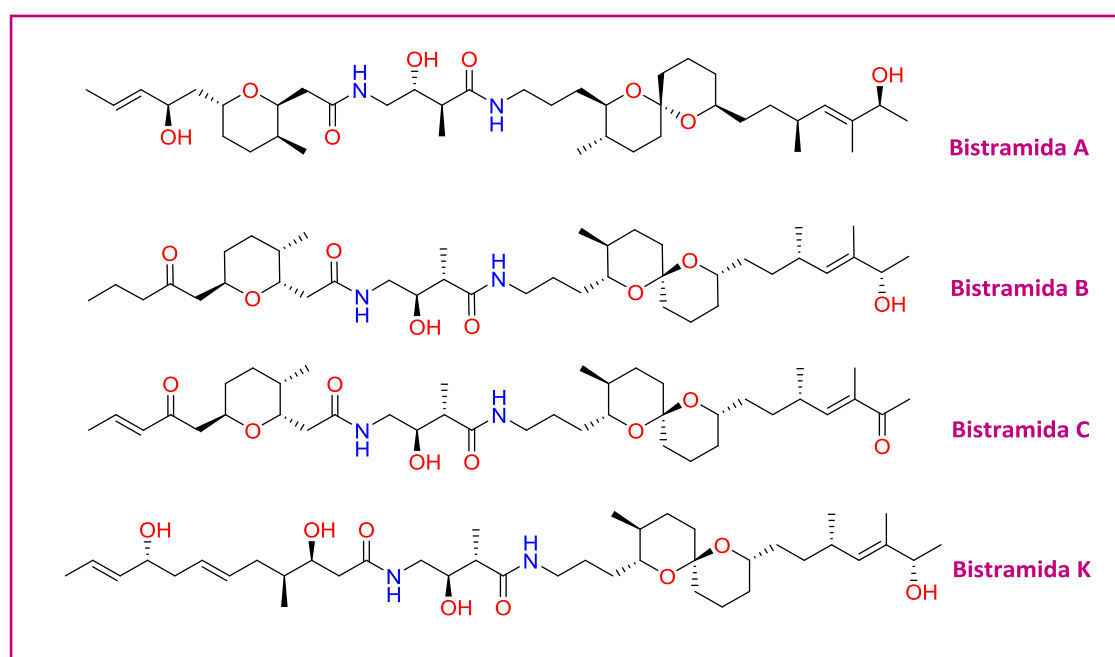


Figura 112. Estructuras de bistramidas A,B,C y K.

⁶⁷ Degnan, B. M.; Hawkins, C. J.; Lavin, M. F.; McCaffrey, E. J.; Parry, D. L.; Watters, D. J. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1354-1359.

⁶⁸ Long, P. F.; Dunlap, W. C.; Battershill, C. N.; Jaspars, M. *ChemBioChem*, **2005**, *6*, 1760-1765.

⁶⁹ Schmidt, E. W.; Nelson, J. T.; Rasko, D. A.; Sudek, S.; Eisen, J. A.; Haygood, M. G.; Ravel, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2005**, *102*, 7315-7320.

⁷⁰ Muenchhoff, J.; Hirose, E.; Maruyama, T.; Sunairi, M.; Burns, B.; Neilan, B. *From Environmental Microbiology*, **2007**, *9*, 890-899.

⁷¹ Biard, J-F.; Roussakis, C.; Kornprobst, J-M.; Gouiffes-Barbin, D.; Verbist, J-F.; Cotellet, P.; Foster, M.; , Ireland, C. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1336-1345.

Un caso especial es la cycloxazolina, cuyo aislamiento de *Lissoclinum bistratum* se publicó en 1992,⁷² que consiste en un hexapéptido que contiene tres anillos de oxazolina. Presenta una actividad citotóxica con una IC₅₀ de 0.5 µg/mL. Ese mismo año se reportó el aislamiento de Westiellamida⁷³ del alga azul-verde terrestre *Westiellopsis prolifica*, que posee la misma estructura que la cycloxazolina, lo que evidenció que la formación de los péptidos cíclicos procedentes de *Lissoclinum* deben de tener como origen el simbiote *Prochloron* sp.

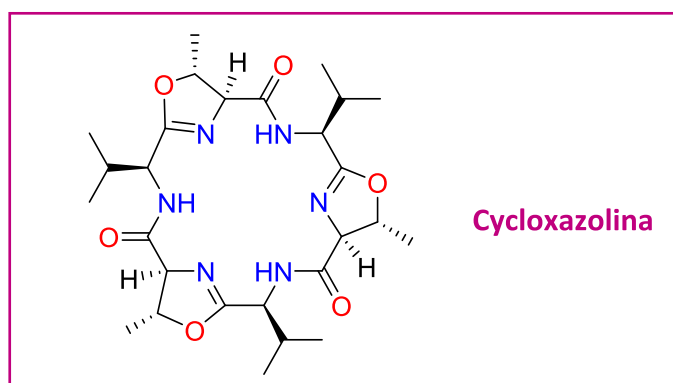


Figura 113. Estructura de cycloxazolina.

En 1993 se reportó el aislamiento de dos heptapéptidos cíclicos llamados nairaiamidas A y B. Se caracterizan por que ambos compuestos poseen dos aminoácidos de prolina pero que no contienen ningún anillo de tiazol, oxazol, tiazolina u oxazolina.⁷⁴ La única diferencia entre ambas consiste en que la nairaiamida A posee una valina, mientras que en la nairaiamida B, en vez de valina presenta una isoleucina.

⁷² Trevor, W. H.; Hawkins, C. J.; Lavin, M. F.; Van den Brenk, A.; Watters, D. J. *Tetrahedron*. **1992**, 48, 341–348

⁷³ Prinsep, M. R.; Moore, R. E.; Levine, I. A.; Patterson, G. M. J. *Nat. Prod.* **1992**, 55, 140–142.

⁷⁴ Foster, M. P.; Ireland, C. M. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 2871–2874.

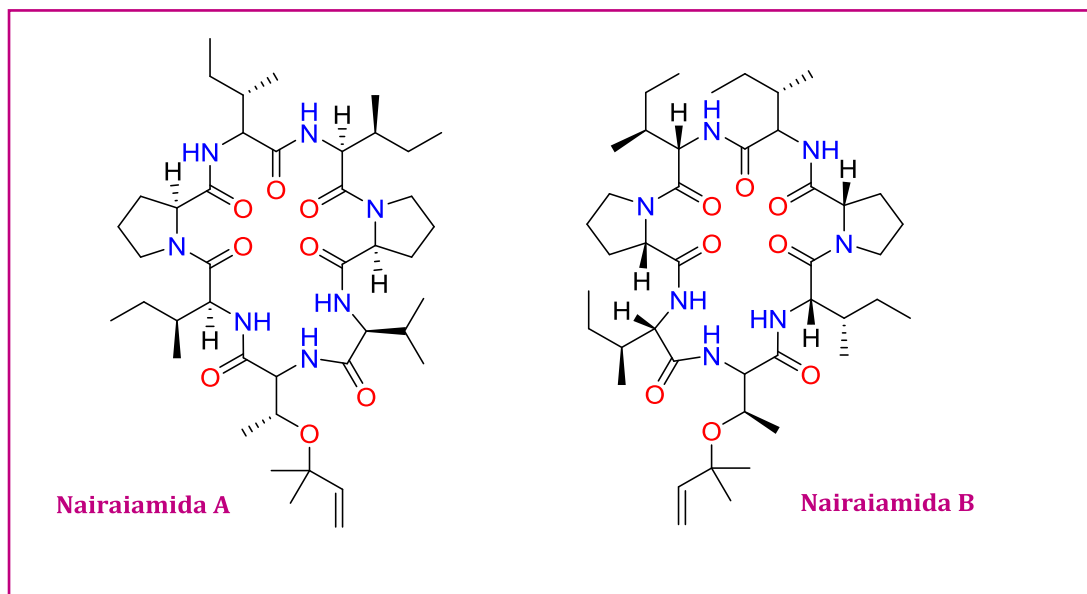


Figura 120. Estructuras de nairaiamidas A y B.

En 1989, Degnan y col, describieron el aislamiento de las bistratamidas A y B de *Lissoclinum bistratum*.⁷⁵ La evaluación de la actividad de estos compuestos frente a células tumorales (fibroblastos y vejiga), mostró unos valores de IC₅₀ del orden µg/mL. Tres años más tarde se publicó el aislamiento de las bistratamidas C y D, cuya diferencia principal se encuentra en la sustitución del aminoácido fenilalanina por valina.⁷⁶ Faulkner y col, en 2003, reportaron el aislamiento de otras seis bistratamidas (E-J),⁷⁷ que muestran actividad moderada frente a células tumorales de colon, destacando que los compuestos que contienen dos anillos de tiazol fueron más activos que aquellos que contienen un anillo de tiazol y oxazol.

⁷⁵ B. M. Degnan, C. J. Hawkins, M. F. Lavin, E. J. McCaffrey, D. L. Parry, D. J. W. J. Med. Chem. **1989**, 32, 1354–1359.

⁷⁶ Mark P. Foster, Gisela P. Concepcion Gina B. Caraan, C. M. I. J. Org. Chem. **1992**, 57, 6671–6675.

⁷⁷ Perez, L. J.; Faulkner, D. J. J. Nat. Prod. **2003**, 66, 247–250.

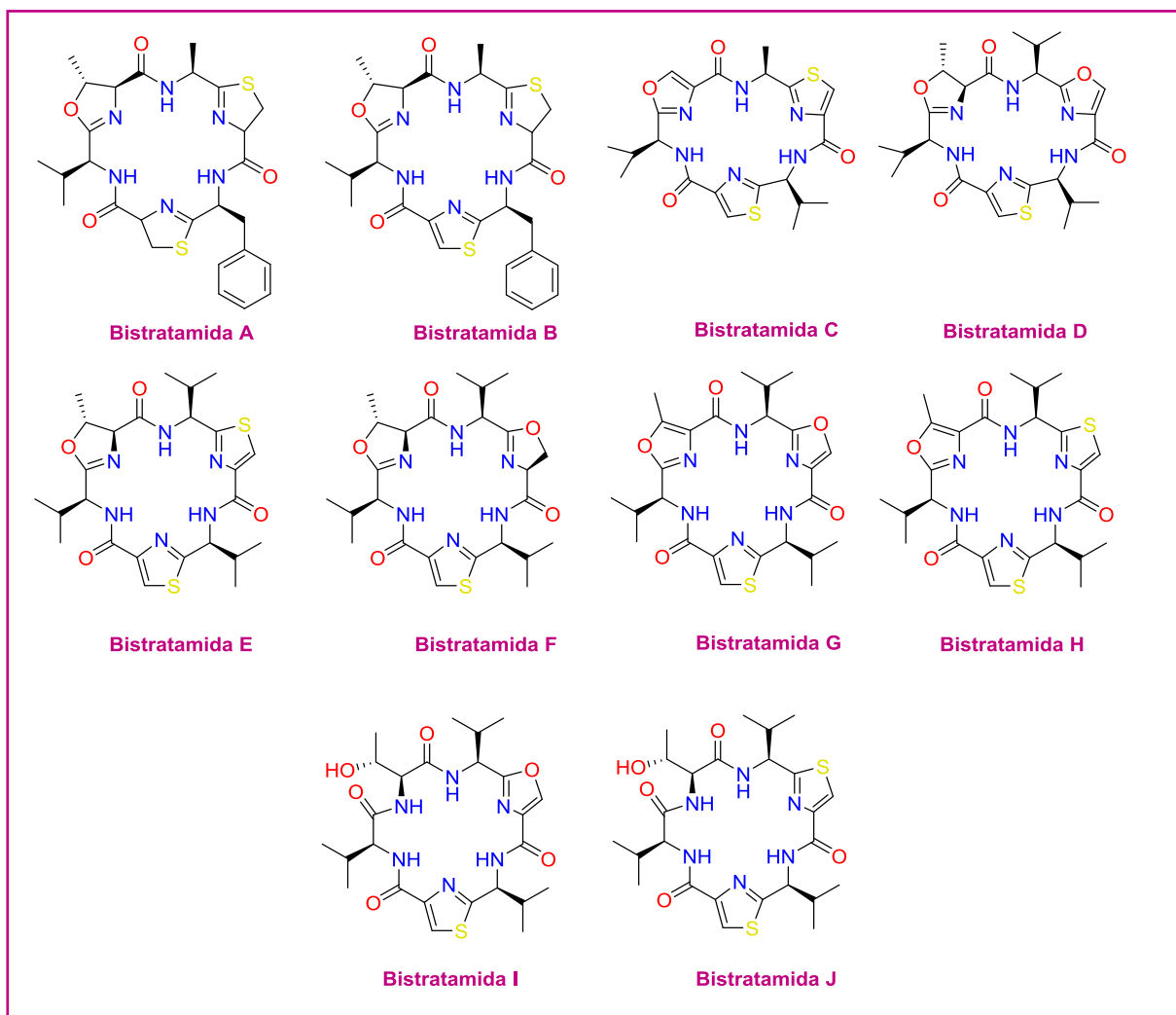


Figura 115. Estructuras de bistratamidas A-J.

Por último, nuestro equipo de investigación de PharmaMar, reportó en 2013 el aislamiento de las bistratamidas K y L, así como las bistratamidas M y N que son objeto de estudio en este capítulo de la presente Tesis Doctoral.⁷⁸ La diferencia principal entre la pareja de bistratamidas K y L con respecto a la pareja M y N reside en la sustitución de los aminoácidos fenilalanina y treonin por la isoleucina y serina, respectivamente.

⁷⁸ Urda, C.; Gómez, E.; Reyes, F.; García-Cerezo, A.; Tanaka, J.; de Eguilior, C.; Bueno, S.; Cuevas, C. **2013**, P 184. 14th Symposium on Marine Natural Product / 8th European Conference on Marine Natural Products.

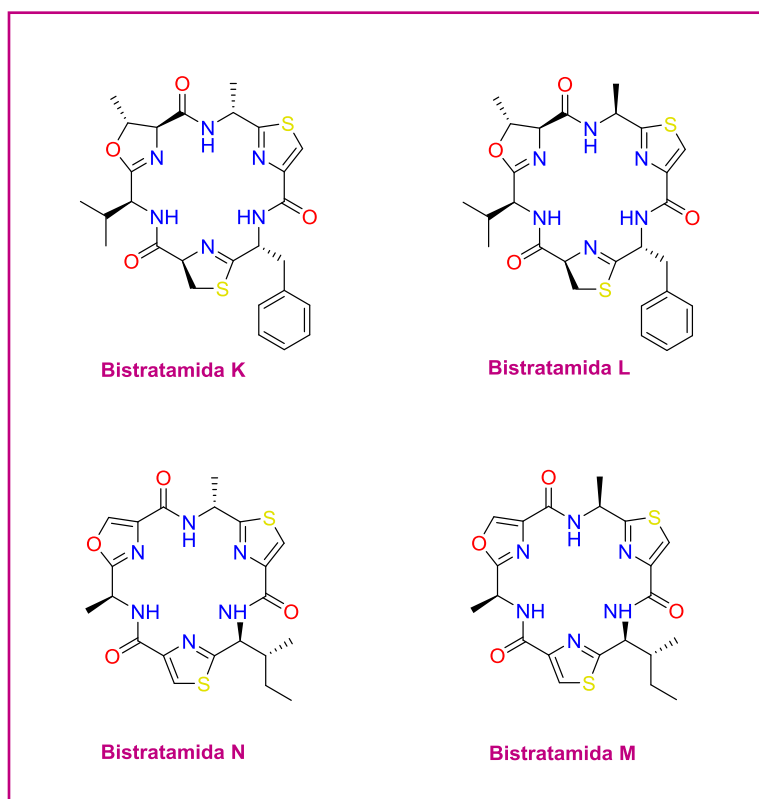


Figura 116. Estructuras de bistratamidas K-M.

5.2 Resultados y discusión

5.2.1 Identificación y clasificación

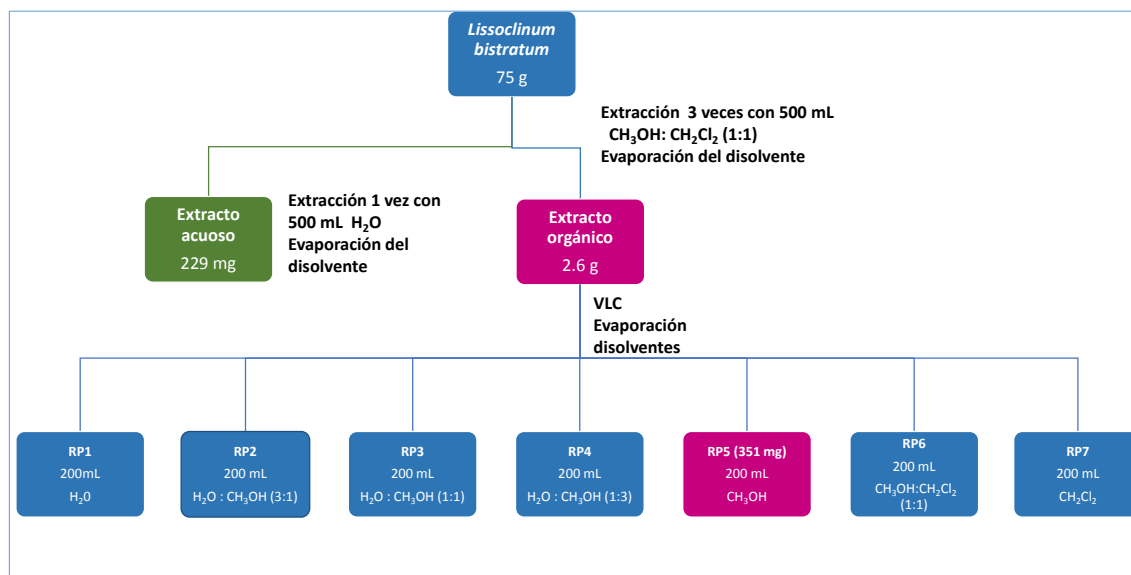
El tunicado *Lissoclinum bistratum* se recolectó en Raja Ampat, Indonesia (Figura 117) a mano y se congeló inmediatamente por el Departamento de Expediciones de PharmaMar fue codificada y depositada en PharmaMar con el código ORMA48136. La identificación taxonómica de este tunicado fue realizada por el Dr Xavier Turón (CEAB-Centro de Estudios Avanzados de Blanes, España).



Figura 117. Fotografía del tunicado *Lissoclinum bistratum* y localización de la región donde fue recolectada.

5.2.2 Extracción y fraccionamiento

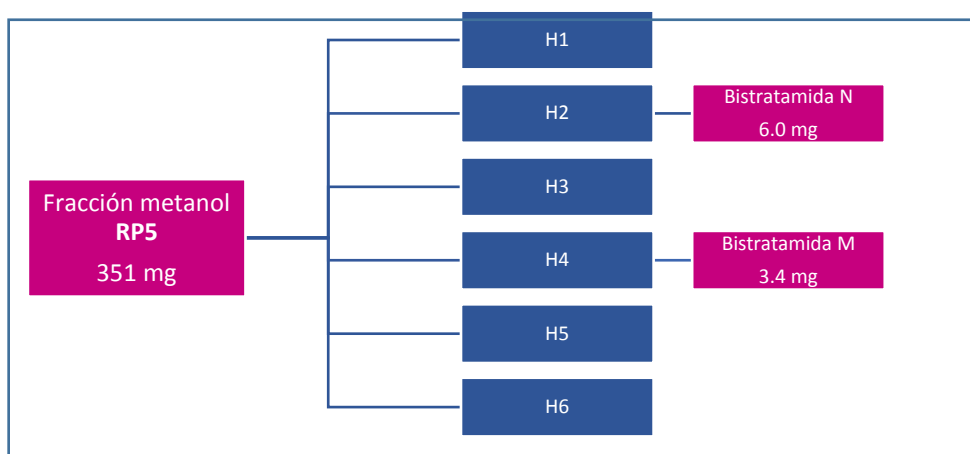
Con el fin de extraer los metabolitos secundarios causantes de la actividad, este tunicado fue cortado en pequeños trozos, extrayéndose posteriormente repetidas veces con metanol. El extracto metanólico se fraccionó entre distintas mezclas de disolventes en orden creciente de polaridad, aprovechándose así el distinto coeficiente de reparto que presentan los componentes de los extractos orgánicos en cada uno de los sistemas de disolventes (ver Esquema 6).



Esquema 6. Extracción y fraccionamiento del extracto orgánico del tunicado *Lissoclinum bistratum*.

5.2.3 Aislamiento y purificación

La fracción activa RP5 se separó por HPLC obteniéndose 6 fracciones. El bioensayo de las fracciones obtenidas mostró que las fracciones H2 y H4 eran las únicas que mostraban actividad citotóxica. La posterior purificación por HPLC de dichas fracciones permitió aislar compuestos puros que se denominaron bistratamida M (5) y N (6).



Esquema 7. Esquema de aislamiento de bistratamida M (5) y N (6) de la fracción de metanol (RP5).

5.2.4 Determinación estructural

5.2.4.1 Determinación de la estructura plana de bistratamida M (5)

La determinación de la estructura de la bistratamida M (5) se llevó a cabo mediante diversas técnicas de RMN junto con los datos de espectrometría de masas. La fórmula molecular de $C_{21}H_{24}N_6O_4S_2$ (13 grados de insaturación) se determinó a partir del aducto $[M+H]^+$ a m/z de 489.1405 detectado en su espectro de alta resolución (+)-HRES-TOFMS.

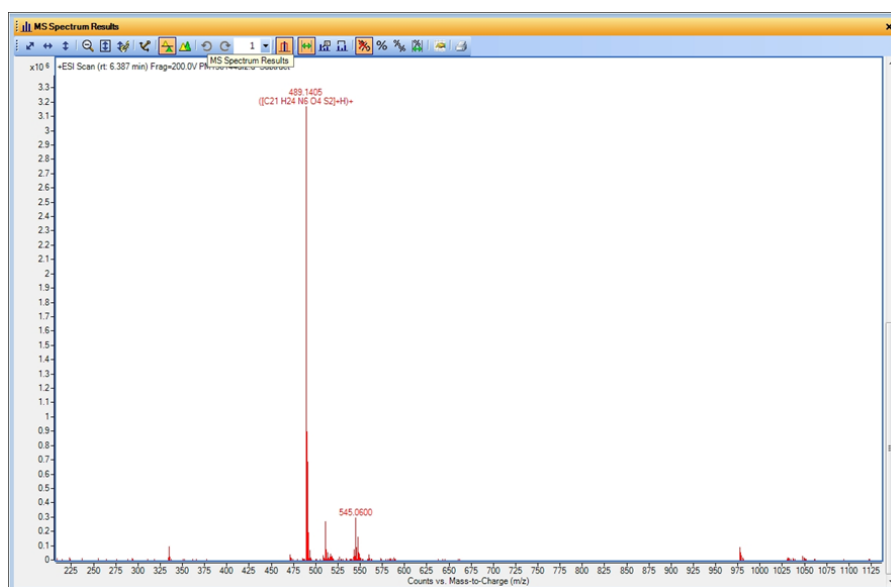


Figura 118. Espectro de masas de bistratamida M (5).

Un total de 21 señales se observan en el espectro de RMN ^{13}C de **5** (Figura 119). Teniendo en cuenta la presencia en la fórmula molecular de seis átomos de nitrógeno y observando en el espectro de RMN ^{13}C seis señales entre 159.4 y 171.6 ppm, tres señales a 44.2, 48.2 y 55.3 ppm (características de carbonos en posición α en residuos de aminoácidos) junto con tres señales de NH (8.42, 8.64 y 8.69 ppm) observados en el espectro de 1H (Figura 120), se dedujo que el compuesto **5** posee una estructura de naturaleza peptídica. Además, se observaron seis señales entre 123.0 y 148.2 ppm atribuibles a señales de carbono de doble enlace y cinco señales a 40.1, 26.3, 23.9, 14.5 y 11.5 ppm.

La comparación con los datos espectrales de bistratamida M (**5**) con las de las bistratamidas descritas junto con el análisis de los datos de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC y HMBC de **5**, se llegó a la conclusión de la presencia, en la bistratamida M (**5**), de tres residuos de aminoácidos estándar (dos alaninas y una isoleucina) y de tres residuos de aminoácidos modificados correspondientes a los dos anillos tiazol y al anillo de oxazol).

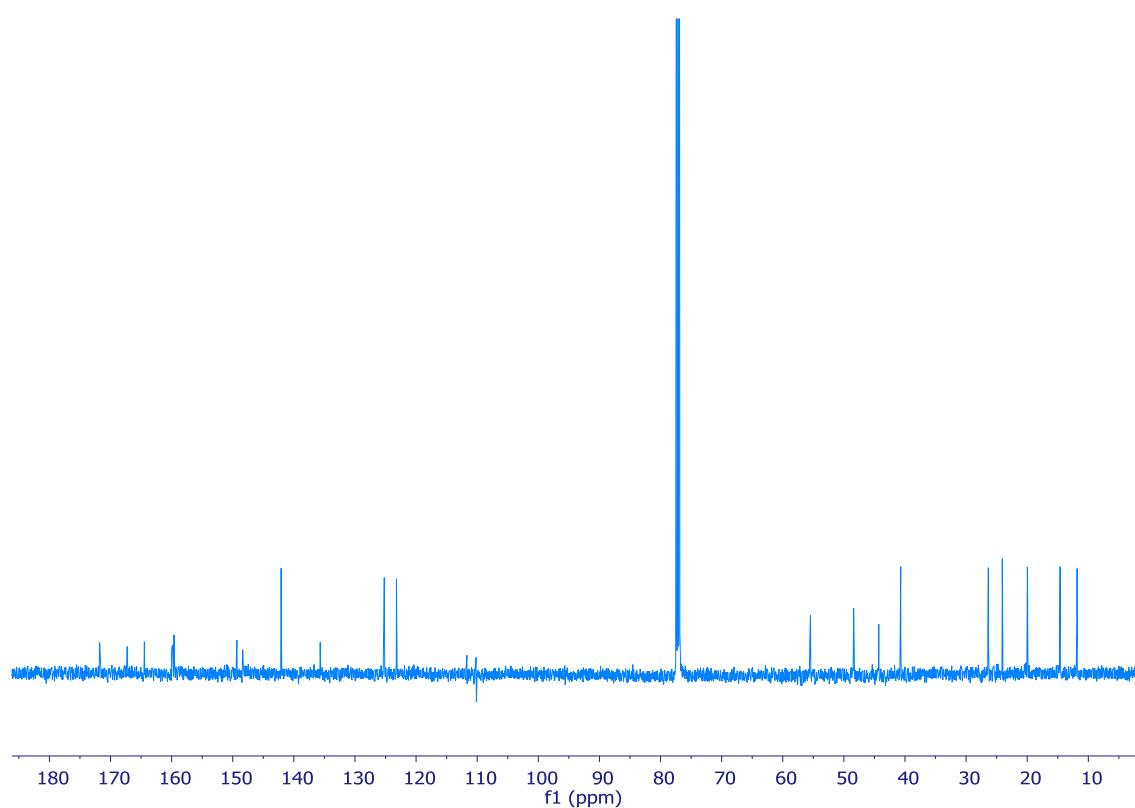


Figura 119. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de bistratamida M (**5**).

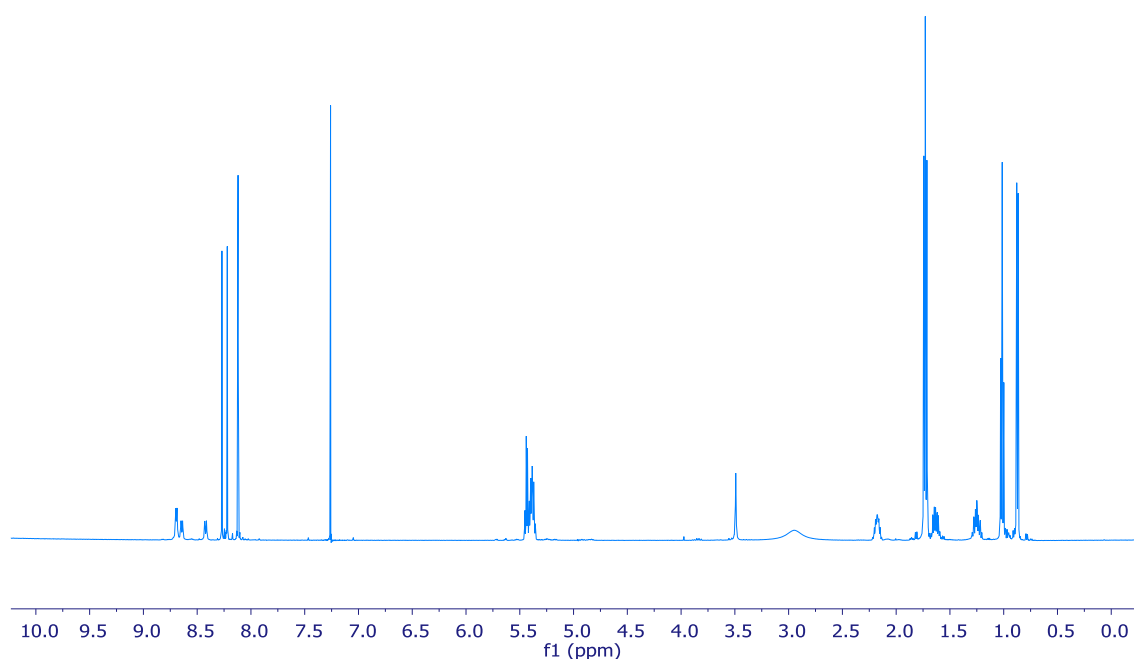


Figura 120. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de bistratamida M (**5**).

Una búsqueda en la base de datos de compuestos marinos MARINLIT a partir de esos datos dio como resultado una serie de compuestos llamados bistratamides que presentaban bastante similitud. Esta familia de compuestos presenta tres aminoácidos estándares junto con otros tres aminoácidos modificados.

Continuando con el estudio combinado de los espectros de RMN ^{13}C , ^1H , COSY y HSQC de bistratamida M (**5**), se dedujeron los siguientes grupos: tres dobles enlaces trisustituídos (δ_{H} 8.12, 8.22 y 8.27), cuatro metinos, siendo tres de ellos característicos de carbonos en la posición α de aminoácidos y finalmente, tres metilos dobletes (δ_{H} 0.97, 1.72 y 1.75) y un metilo triplete a 1.02 ppm. Los metinos singuletes a 8.12 (H-9), 8.22 (H-18) y 8.27 (H-3) ppm, son característicos de protones olefínicos que están formando parte de un heterociclo del tipo oxazol y/o tiazol, como ocurre en el caso de las bistratamides. De acuerdo con los desplazamientos

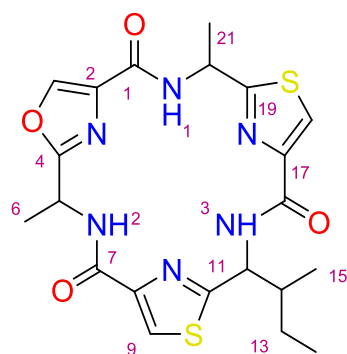
químicos de las tres señales singuletes, dos de ellas, H-9 (δ_{C} 123.0/ δ_{H} 8.12) y H-18 (δ_{C} 125.0/ δ_{H} 8.22) se asignaron a anillo de tiazol, mientras que H-3 (δ_{C} 141.9/ δ_{H} 8.27) se asignó a un anillo de oxazol.⁷⁹

La comparación con los datos espectrales de bistratamida M (**5**) con las de las bistratamidas descritas junto con el análisis de los datos de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC y HMBC de **5**, se llegó a la conclusión de la presencia, en la bistratamida M (**5**), de tres residuos de aminoácidos estándar (dos alaninas y una isoleucina) y de tres residuos de aminoácidos modificados correspondientes a los dos anillos tiazol y al anillo de oxazol).

⁷⁹ Portmann, C.; Blom, J. F.; Kaiser, M.; Brun, R.; Ju, F.; Gademann, K. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1891–1896.

Tabla 14. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) de bistratamida M (5).

Pos.	δ_{C} , mult	δ_{H} , mult., (J in Hz)
1	159.7, C	
2	135.5, C	
3	141.9, CH	8.27, s
4	164.3, C	
5	44.2, CH	5.38, m
6	19.9, CH_3	1.72, d (7.1)
7	159.4, C	
8	149.2, C	
9	123.0, CH	8.12, s
10	167.1, C	
11	55.3, CH	5.44, m
12	40.1, CH	2.18, m
13	26.3, CH_2	1.63, m; 1.24, m
14	11.5, CH_3	1.01, t (7.4)
15	14.5, CH_3	0.87, d (6.8)
16	159.8, C	
17	148.2, C	
18	125.0, CH	8.22, s
19	171.6, C	
20	48.2, CH	5.40, m
21	23.9, CH_3	1.74, d (6.9)
NH-1		8.69, d (5.7)
NH-2		8.64, d (7.2)
NH-3		8.42, d (8.0)

**14 Bistratamida M**

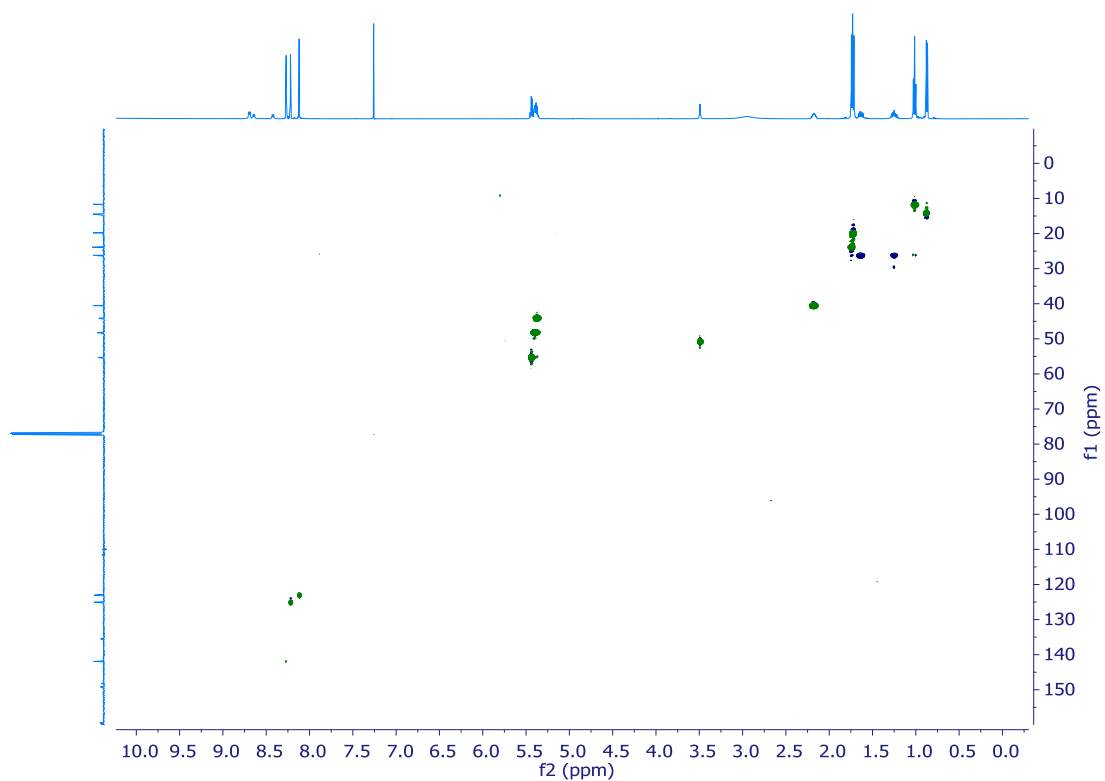


Figura 121. Espectro HSQC (500 MHz, CDCl₃) de bistratamida M (5). Señales de color azul corresponden a grupos metileno.

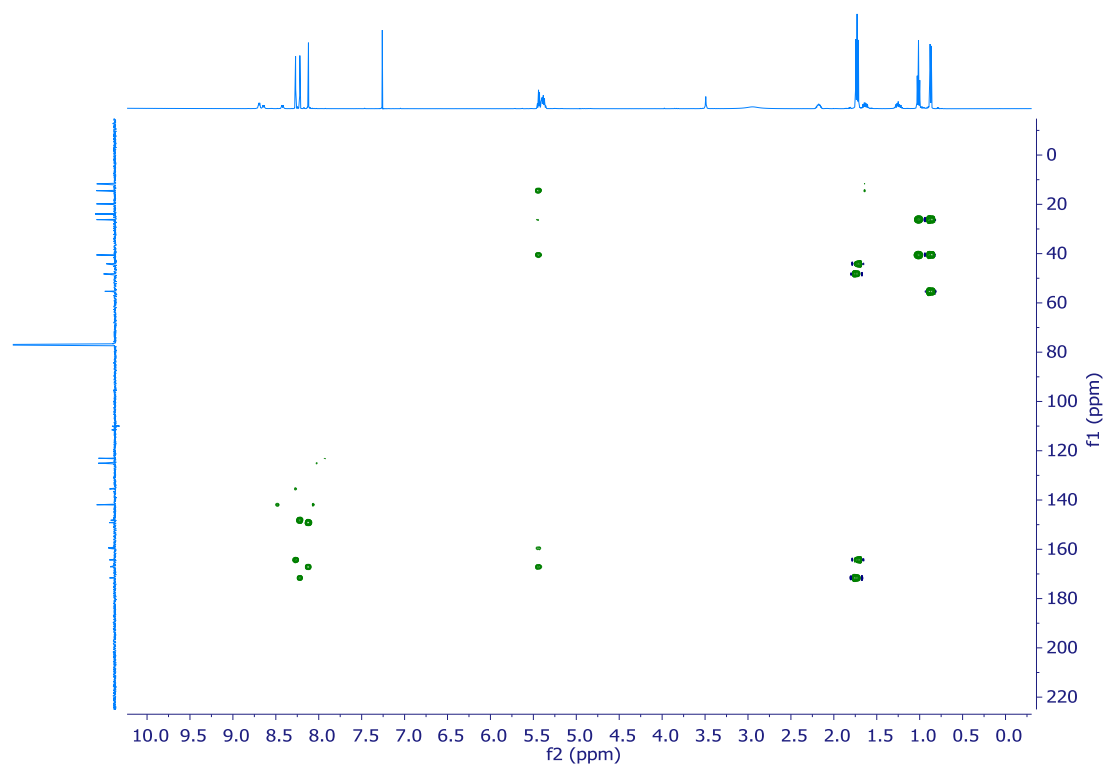


Figura 122. Espectro HMBC (500 MHz, CDCl₃) de bistratamida M (5).

El estudio del experimento COSY permitió establecer tres sistemas de spin que corresponden a tres residuos de aminoácido: dos alaninas y una isoleucina. La correlación COSY entre el protón en la posición α a 5.40 ppm (H-20) y un metilo que resonó como doblete a 1.74 ppm (H-21) indicó la presencia de una alanina. De esta misma forma, se determinó la existencia de un segundo aminoácido de alanina al observarse una correlación COSY entre el protón en la posición α a 5.38 (H-5) ppm y el metilo doblete a 1.72 ppm (H-6). Finalmente, la existencia de un residuo de isoleucina se dedujo a partir de la correlación del protón H-11 en posición α del aminoácido (δ_H 5.44) con un metino a 2.18 ppm (H-12) que a su vez se correlaciona, por un lado, con un metilo que resuena como doblete a 0.87 ppm (H-15) y, por otro, con un metileno a 1.25 y 1.63 ppm (H-13). Por último, la señal a 1.63 ppm se acopla con un metilo que resuena como triplete a 1.01 ppm (H-14). Se finalizó el estudio del COSY estableciendo la unión de los distintos NH con sus respectivos protones en α de los aminoácidos, mediante las correlaciones observadas entre NH-1 (δ_H 8.69) con el protón H-20 (δ_H 5.40) de una alanina, entre NH-2 (δ_H 8.64) con el protón H-5 (δ_H 5.38) de la otra alanina y entre NH-3 (δ_H 8.42) con el protón H-11 (δ_H 5.44) de la isoleucina.

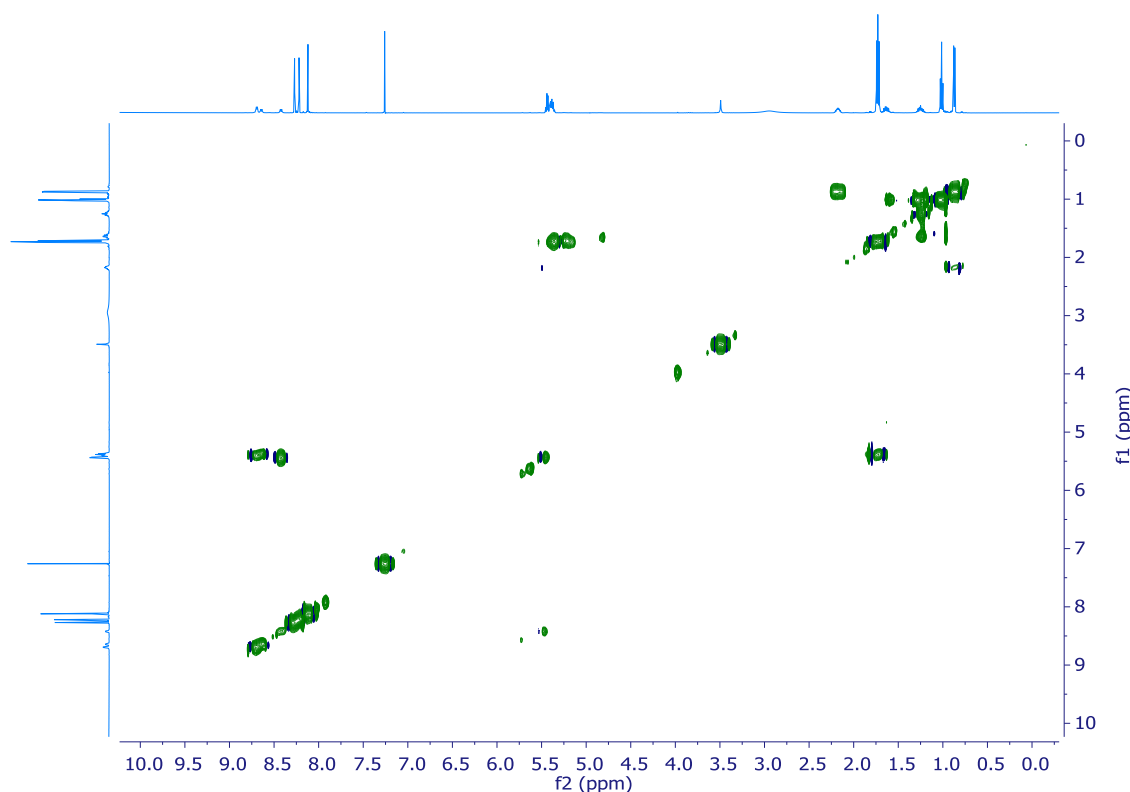


Figura 123. Espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) de bistratamida M (**5**).

La secuencia de los aminoácidos se estableció a través de las correlaciones a larga distancia observadas en el espectro HMBC de **5** (Figura 122). La correlación a larga distancia entre el NH-1 (δ_{H} 8.69) con el carbono C-20 (δ_{C} 48.2), que corresponde a la posición α de la alanina, y la correlación entre el metilo doblete de la alanina H-21 (δ_{H} 1.74) con C-19 (δ_{C} 171.6), perteneciente a un anillo de tiazol, permitió conectar dicho anillo con el residuo de alanina. El protón singulete H-18 (δ_{H} 8.22) se identificó fácilmente en el anillo de tiazol a partir de la correlación a larga distancia con C-19 (δ_{C} 171.6). La localización del residuo de isoleucina entre los dos anillos de tiazol se dedujo mediante las correlaciones a larga distancia observadas entre su protón α a 8.42 ppm con C-10 (δ_{C} 167.1) y C-16 (δ_{C} 159.8). A su vez, el carbono C-10 mostró una correlación HMBC con el singulete H-9 (δ_{H} 8.12). El grupo carbonilo C-7 (δ_{H} 159.4) se encuentra adyacente a este segundo anillo de tiazol al observarse una correlación a

larga distancia con H-9. No se observó ninguna correlación HMBC entre el carbonilo C-7 con ningún NH, pero teniendo en cuenta que dos de los tres NH están asignados y localizados (NH-1 y NH-3) se concluyó que NH-2 (δ_H 8.34) debe estar unido a este grupo carbonilo. Finalmente, NH-2 correlaciona en el espectro HMBC con el carbono en posición α de la alanina, C-5 (δ_C 44.2) y con C-4 (δ_H 164.3) que pertenece al anillo de oxazol. De esta forma se determinó que una segunda alanina está conectada al anillo de oxazol.

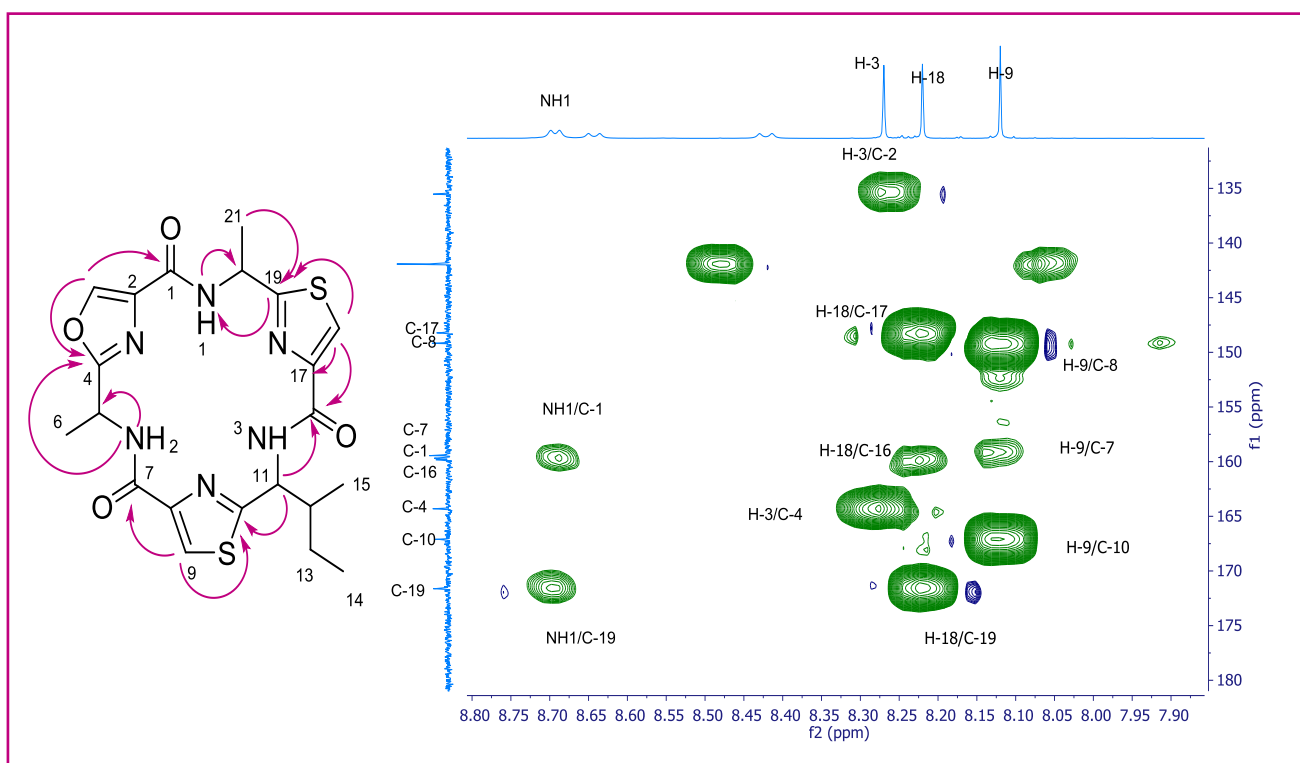
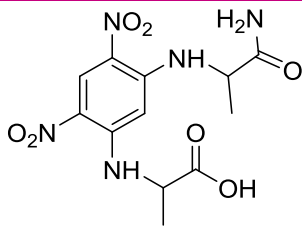
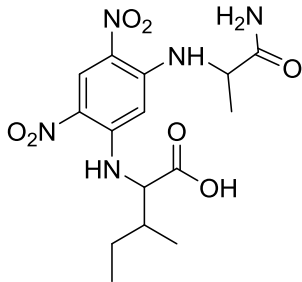


Figura 124. Correlaciones observadas en el HMBC para bistratamida M (5).

5.2.4.2 Determinación de la estereoquímica absoluta de bistratamida M (5)

La configuración absoluta de los tres aminoácidos en bistratamida M (5), se estableció mediante la aplicación del método de Marfey para las dos alaninas y el método avanzado de Marfey⁸⁰ para la isoleucina. Para ello, fue necesario realizar una reacción de hidrólisis ácida seguido de un proceso de ozonólisis para obtener los tres aminoácidos libres. Mediante la reacción de hidrólisis se fragmentan los enlaces peptídicos y los anillos de oxazol, mientras que los anillos de tiazol se fragmentan al realizar un proceso de ozonólisis. Los residuos obtenidos se derivatizaron con el reactivo de Marfey (1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-alanina amida, L-FDAA), se separaron y se identificaron mediante HPLC-MS a través de la monitorización selectiva de los iones correspondientes a la unión de aminoácido y el reactivo de Marfey (Tabla 15).

Tabla 15. Estructura, peso molecular e ion $[M+H]^+$ de los aminoácidos derivatizados de bistratamida M (5).

Aminoácido (aa)	Estructura aa + FDAA	Peso molecular aa	Peso molecular aa + FDAA	Ión $[M+H]^+$ HPLC-MS
Alanina		89	341	342
Isoleucina		131	383	384

⁸⁰ Harada, K.; Fujii, K.; Hayashi, K.; Suzuki, M.; Ikai, Y.; Oka, H. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 3001–3004.

El monitoreo selectivo del ion de relación m/z 342 resultó en la obtención de un pico con un t_R a 14.1 min que se identificó como alanina. De igual forma, la monitorización selectiva del ion de relación m/z 384 (isoleucina) presentó un t_R de 23.8 min.

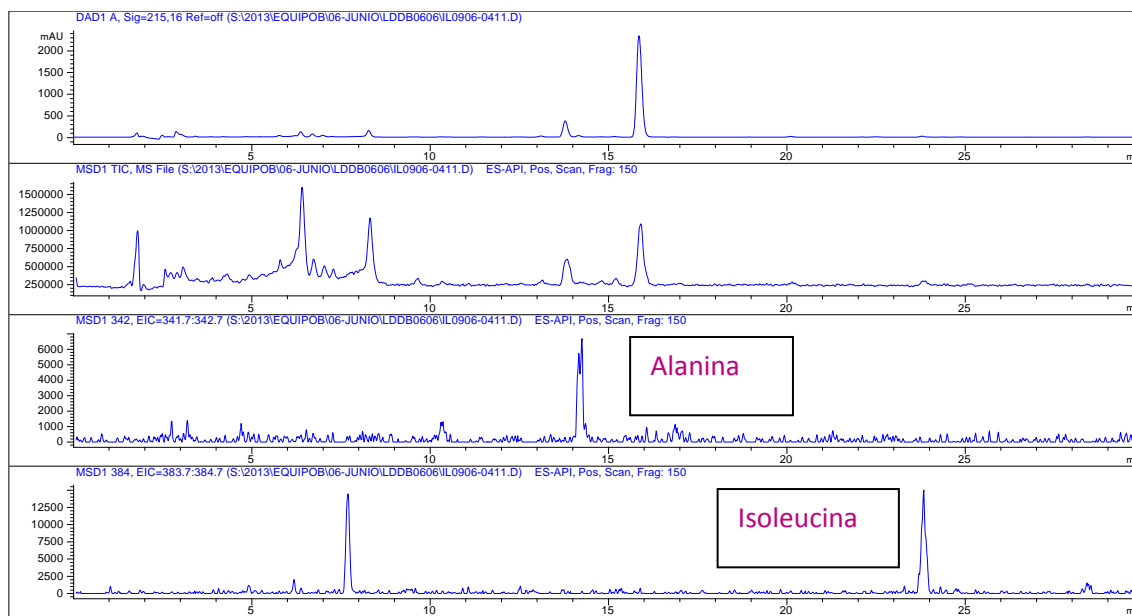


Figura 125. HPLC-MS y monitorización selectiva del ion de relación m/z para alanina e isoleucina derivatizados con L-FDAA.

La estereoquímica absoluta de las dos alaninas se determinó mediante la comparación de los t_R de los patrones de alanina L y D derivatizadas con L-FDAA, con el tiempo de retención obtenido para la alanina obtenida en la hidrólisis de la bistratamida M (**5**). Para el caso de la L-alanina se obtuvo un t_R de 14.3 min, mientras que para el caso de D-alanina el tiempo obtenido fue de 16.8 min (Figura 126).

Teniendo en cuenta que el t_R obtenido para la alanina de nuestro péptido hidrolizado fue de 14.1 min con lo que se determina que la estereoquímica de las dos alaninas en la bistratamida M (**5**) es L.

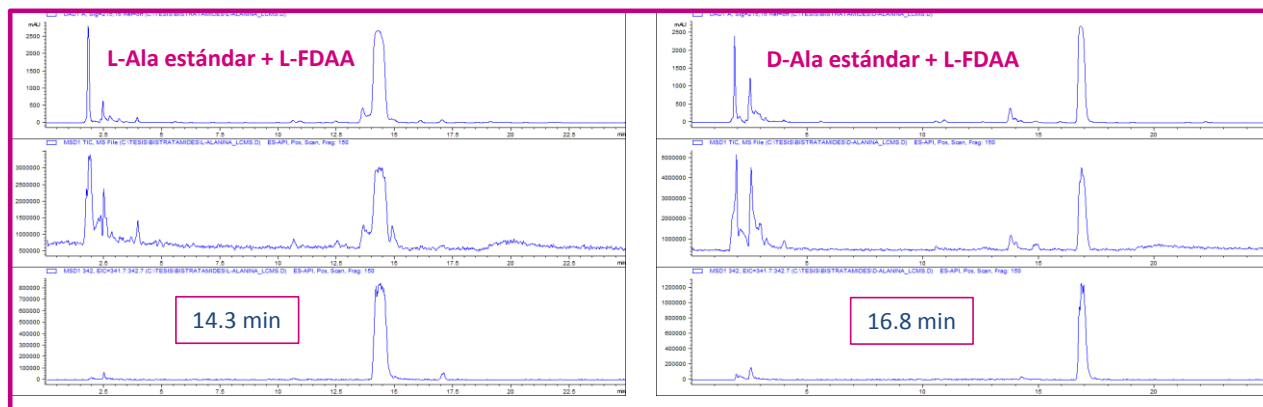


Figura 126. HPLC-MS y monitorización selectiva del ion de relación m/z para L-alanina y D-alanina derivatizadas con L-FDAA.

Para determinar la estereoquímica absoluta de la isoleucina (Figura 128), se procede de la misma manera que como se estableció la estereoquímica de la isoleucina en pembamida (**1**), mediante la aplicación del método avanzado de Marfey descrito en el capítulo 2 de esta Tesis Doctoral.

Los t_R de las cuatro posibles configuraciones de la isoleucina son: 33.9 min para la L-isoleucina, 27.9 min para L-allo-isoleucina, 31.4 min para la D-isoleucina y de 36.0 min para la D-allo-Isoleucina. Dado que el t_R obtenido en el análisis de bistartamida M (**5**) fue de 33.9 min, que se obtuvo por monitorización selectiva del ion de relación m/z 398 de la isoleucina derivatizada con L-FDAA. La comparación con el t_R de los patrones coincidió con el t_R correspondiente a la L-isoleucina.

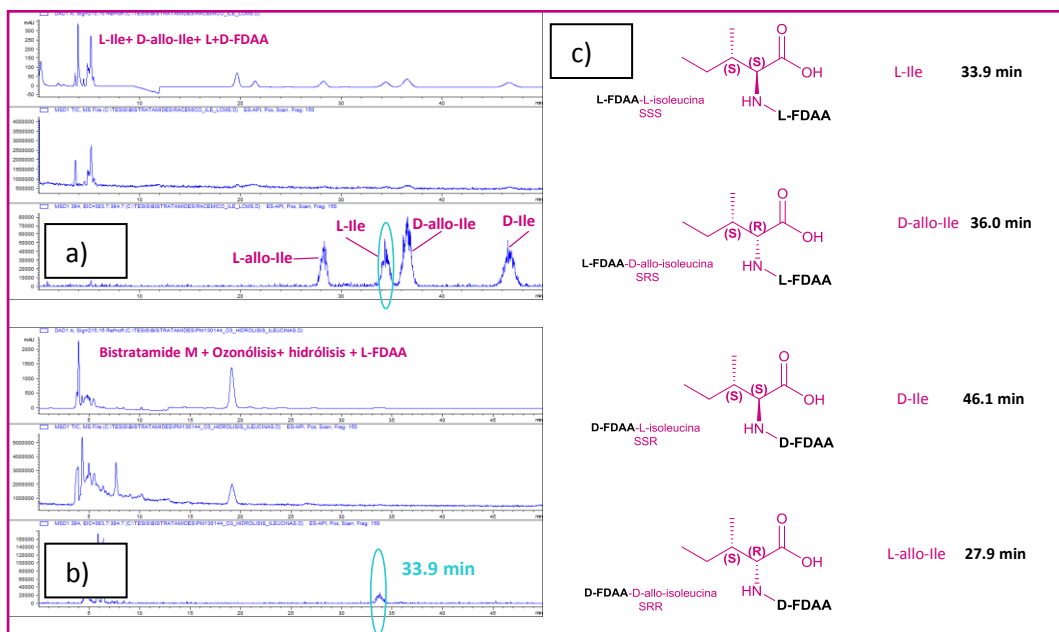


Figura 127. a) HPLC de bistratamida M (5) hidrolizada y derivatizada con L-FDAA, HPLC de los cuatro patrones de la Isoleucina (L, L-allo, D y D-allo), b) monitorización selectiva del ion de relación m/z 398 de la isoleucina y c) estructuras de los cuatro patrones de isoleucina y sus respectivos t_R .

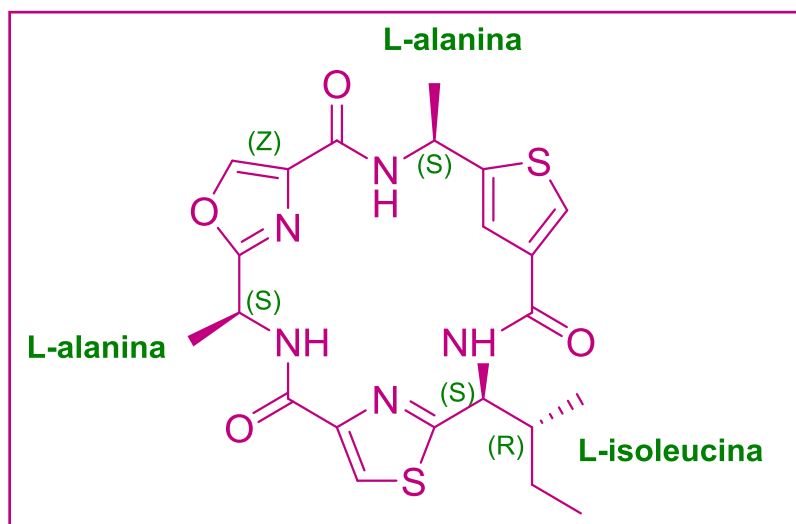


Figura 128. Estructura de bistratamida M (5).

5.2.4.3 Determinación de la estructura plana de bistratamide N (6)

La determinación de la estructura de la bistratamida N se realizó de una manera idéntica que para **5**, mediante técnicas de RMN junto con los datos de espectrometría de masas. El espectro de masas de alta resolución (+)-HRES-TOFMS de **6** muestra el ion $[M+H]^+$ con una relación m/z de 489.1383 que corresponde con la fórmula molecular $C_{21}H_{24}N_6O_4S_2$ y 13 grados de insaturación.

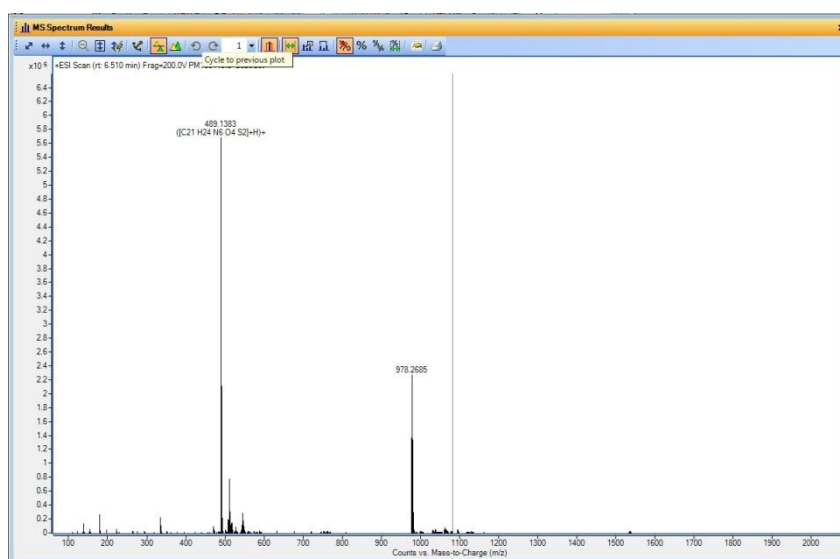


Figura 129. Espectro de masas de bistratamide N (6).

Tras un estudio preliminar de los espectros de RMN de 1H y ^{13}C se observa una gran similitud con los datos de RMN de **5**. Igualmente se observan 21 señales en el espectro de RMN ^{13}C (Figura 130), siendo seis de ellas entre 159.0 y 171.0 ppm. Además, tres señales a 44.1, 47.7 y 54.9 ppm, características de carbonos en posición α en residuos de aminoácidos, junto con tres señales de NH (8.42, 8.64 y 8.69 ppm) observados en el espectro de 1H (Figura 131), sugirió que el compuesto posee una estructura de naturaleza peptídica como en el caso de **5**. Igualmente, se observaron en el espectro RMN de ^{13}C de **6** seis señales entre 123.3 y

148.6 ppm, atribuibles a señales de carbono de doble enlace y cinco señales a 41.5, 25.6, 24.8, 15.1 y 11.6 ppm (Tabla 16).

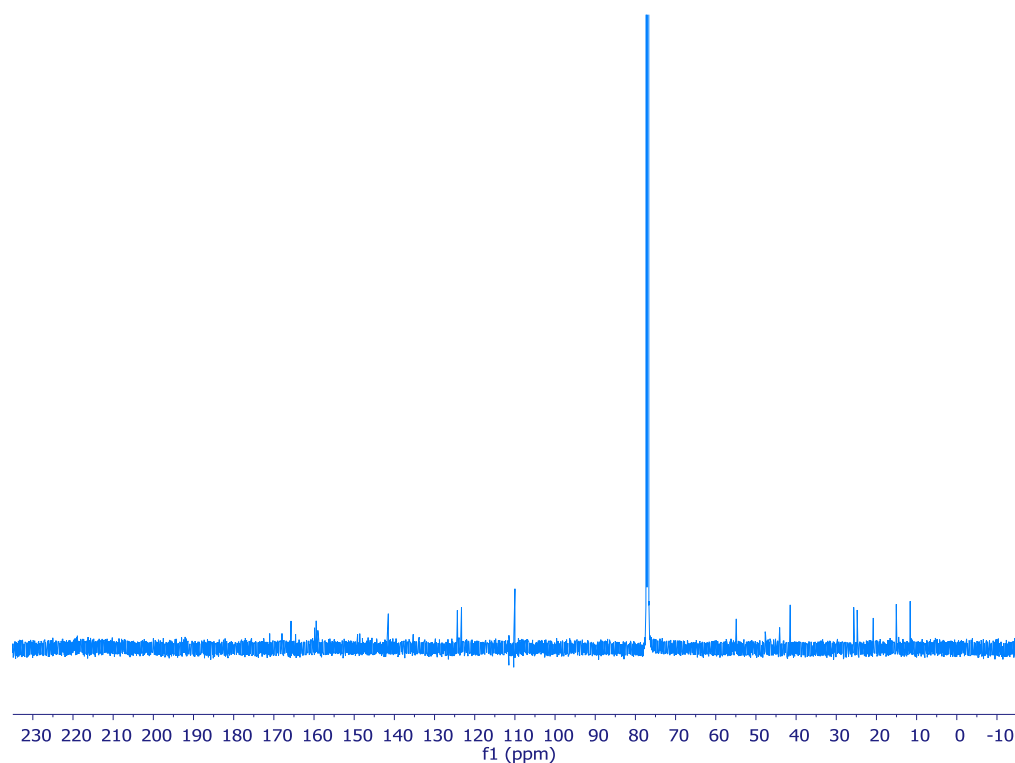


Figura 130. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de bistratamida N (**6**).

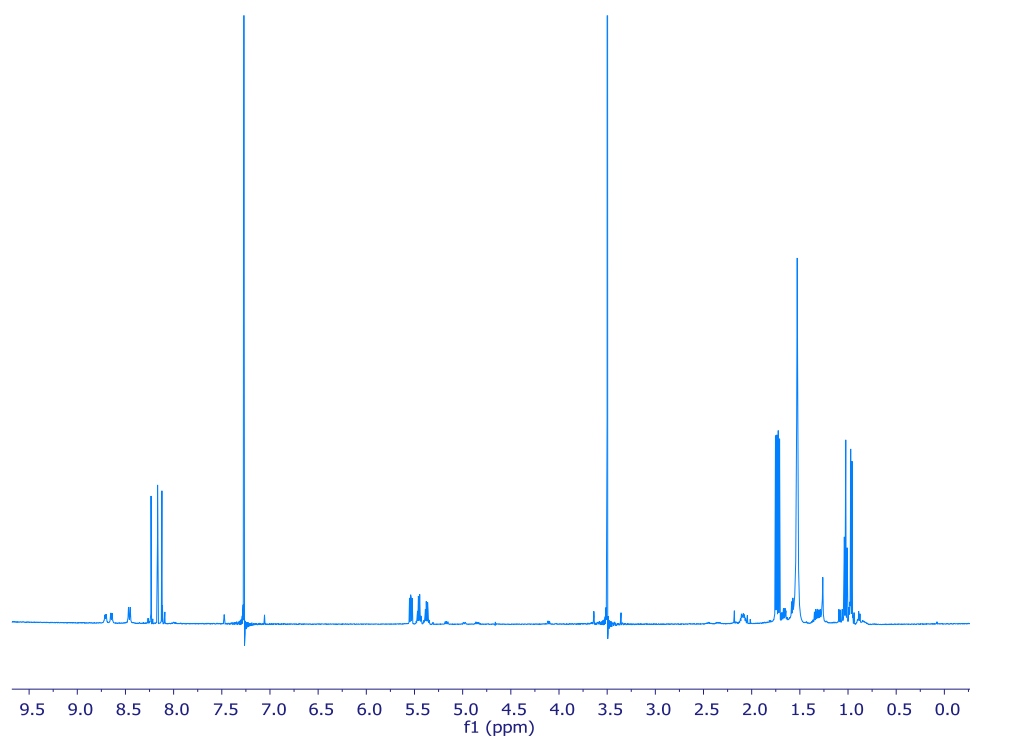


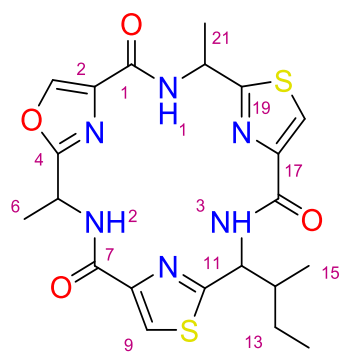
Figura 131. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de bistratamida N (**6**).

El estudio combinado de los espectros de RMN ^{13}C , ^1H , COSY (Figura 134) y HSQC de **6** (Figura 140), permitió identificar los siguientes grupos: tres dobles enlaces trisustituídos (δ_{H} 8.12, 8.17 y 8.23 ppm), cuatro metinos, siendo tres de ellos característicos de carbonos en la posición α de aminoácidos y finalmente, tres metilos dobletes (δ_{H} 0.97, 1.72 y 1.75 ppm) y un metilo triplete a 1.02 ppm. También presentan señales de metinos singuletes que son característicos de protones de doble enlace que están formando parte de un heterociclo tipo oxazol y/o tiazol: 8.12 (H-9), 8.17 (H-18) y 8.23 (H-3) ppm. De igual manera que se hizo para **5**, los desplazamientos químicos de las tres señales singuletes fueron asignados de la siguiente manera: dos de ellas, H-9 (δ_{C} 123.3/ δ_{H} 8.12) y H-18 (δ_{C} 124.3/ δ_{H} 8.17) fueron asignados a un anillo de tiazol, mientras que H-3 (δ_{C} 141.5/ δ_{H} 8.23) se asignó a un anillo de oxazol.⁸¹

⁸¹ Portmann, C.; Blom, J. F.; Kaiser, M.; Brun, R.; Ju, F.; Gademann, K. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1891–1896.

Tabla 16. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) de bistratamida N (6).

Pos.	δ_{C} , mult	δ_{H} , mult., (J in Hz)
1	159.0, C	
2	135.6, C	
3	141.5, CH	8.23, s
4	164.6, C	
5	44.1, CH	5.37, m
6	20.8, CH_3	1.72, d (6.8)
7	159.5, C	
8	149.1, C	
9	123.3, CH	8.12, s
10	167.9, C	
11	54.9, CH	5.54, m
12	41.5, CH	2.09 m
13	25.6, CH_2	1.67, m; 1.32, m
14	11.6, CH_3	1.02, t (7.4)
15	15.1, CH_3	0.97, d (6.8)
16	159.8, C	
17	148.6, C	
18	124.3, CH	8.17, s
19	171.0, C	
20	47.7, CH	5.46, m
21	24.8, CH_3	1.75, d (6.7)
NH-1		8.71, d (6.5)
NH-2		8.65, d (7.3)
NH-3		8.46, d (9.0)



14 Bistratamida N

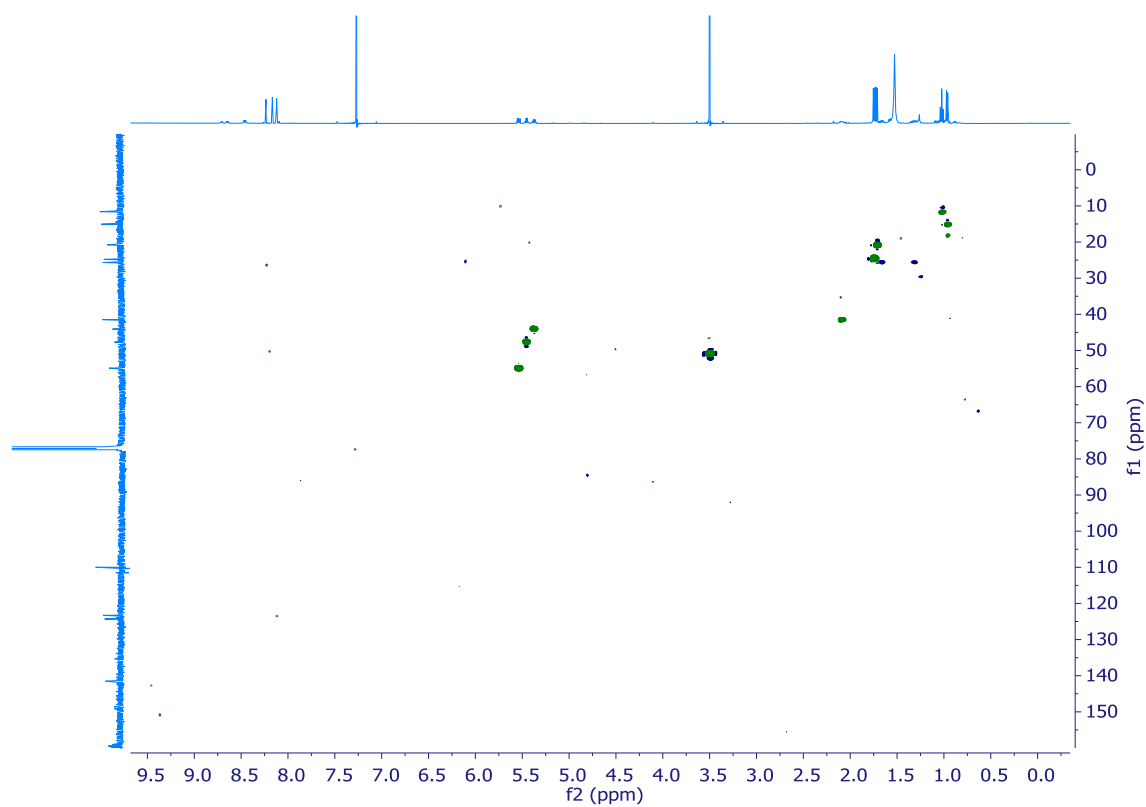


Figura 132. Espectro HSQC (500 MHz, CDCl₃) de bistratamida N (6). Señales de color azul corresponden a grupos metileno.

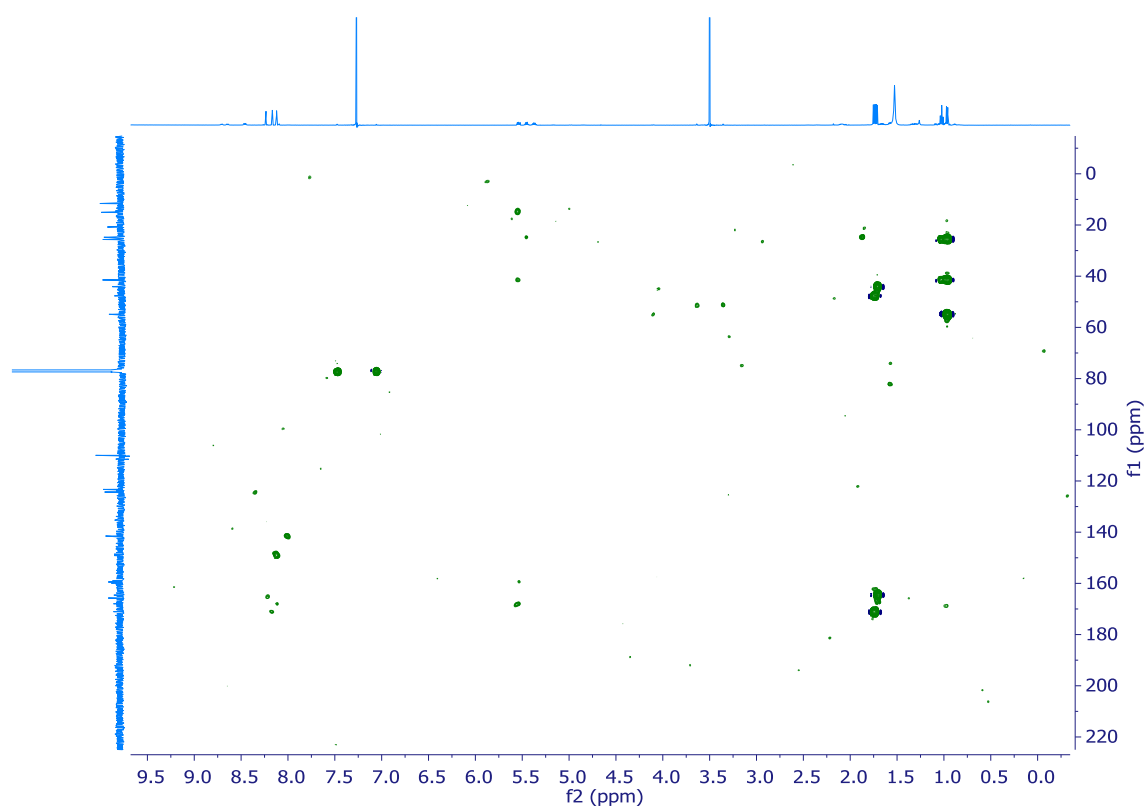


Figura 133. Espectro HMBC (500 MHz, CDCl₃) de bistratamida N (6).

Mediante el estudio del experimento COSY de **6** (Figura 134) se llegó a la misma conclusión que para el caso de la bistratamida M (**5**). La presencia de tres sistemas de spin que corresponden a tres residuos de aminoácido: dos alaninas y una isoleucina. Por lo tanto, el compuesto **6** posee una estructura con la misma fórmula molecular y con los mismos aminoácidos y anillos de tiazol y oxazol que **5**.

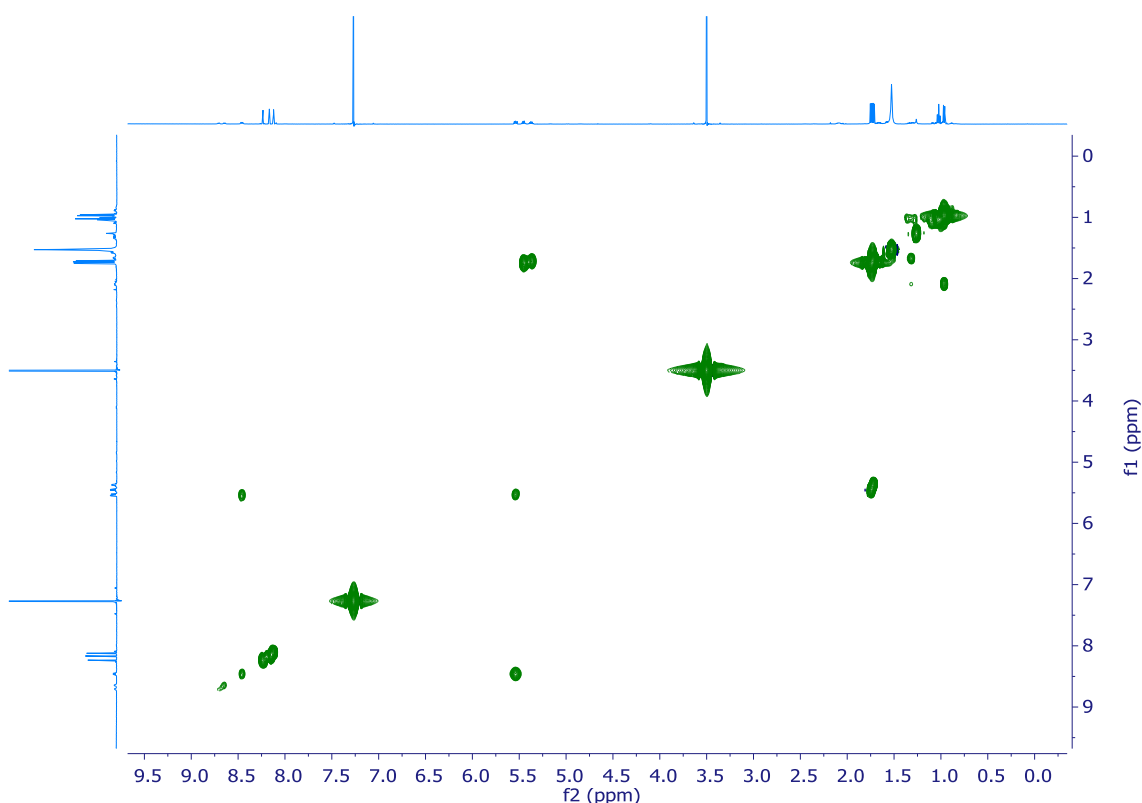


Figura 134. Espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) de bistratamida N (**6**).

La correlación COSY entre el protón en la posición α a 5.46 ppm (H-20) y un metilo que resuena como doblete a 1.75 ppm (H-21) confirmó la presencia de una alanina. De esta misma forma, se determinó la existencia de un segundo aminoácido de alanina al observarse una correlación COSY entre el protón en la posición α a 5.37 (H-5) ppm y el metilo doblete a 1.72 ppm (H-6). Finalmente, la existencia de un residuo de isoleucina se confirmó a partir de la correlación del protón H-11 en posición α del aminoácido (5.54 ppm) con un metino a 2.09 ppm (H-12) que a su vez se

correlaciona, por un lado, con un metilo que resuena como doblete a 0.97 ppm (H-15) y, por otro, con un metileno a 1.32 y 1.67 ppm (H-13). Por último, la señal a 1.67 ppm se acopla con un metilo que resuena como triplete a 1.02 ppm (H-14). Se finalizó el estudio del COSY estableciendo la conexión de los distintos NH con sus respectivos protones en α de los aminoácidos, mediante las correlaciones observadas entre NH-1 (δ_H 8.71) con el protón H-20 (δ_H 5.46) de una alanina, entre NH-2 (δ_H 8.65) con el protón H-5 (δ_H 5.37) de la otra alanina y entre NH-3 (δ_H 8.46) con el protón H-11 (δ_H 5.54) de la isoleucina.

De nuevo, la secuencia de los aminoácidos se estableció a través de las correlaciones a larga distancia observadas en el espectro HMBC de **6** (Figura 135). Se observaron las mismas correlaciones que para **5** lo que indica que ambas estructuras presentan la misma estructura plana.

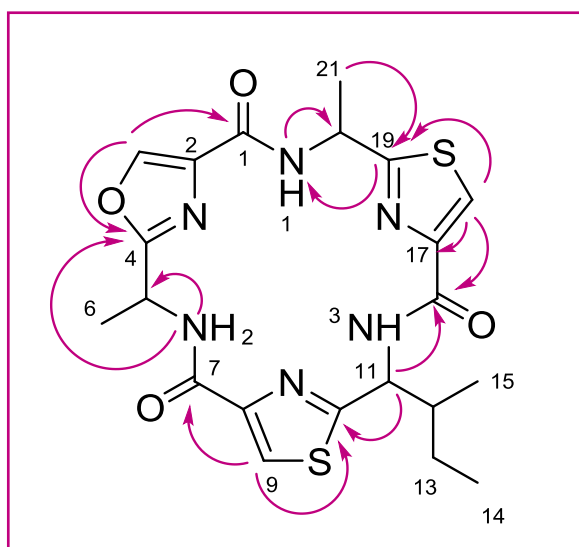


Figura 135. Correlaciones observadas en el HMBC de bistratamida N (**6**).

De la comparación de los espectros de RMN de **5** y **6** se deduce lo siguiente:

- En el espectro de RMN de ^{13}C , las mayores diferencias en los desplazamientos se encuentran en las siguientes posiciones: 1 (δ_{C} 159.7, 159.0), 6 (δ_{C} 19.8, 20.8), 12 (δ_{C} 40.1, 41.5), 13 (δ_{C} 26.3, 25.6), 15 (δ_{C} 14.5, 15.1), 18 (δ_{C} 125.0, 124.3) y 27 (δ_{C} 23.9, 24.8), en donde el primer valor dentro del paréntesis corresponde a **5** y el segundo valor a **6**.
- De igual modo, en el espectro de RMN de ^1H las mayores diferencias en los desplazamientos se encuentran en las posiciones 11 (δ_{H} 5.44, 5.54), 12 (δ_{H} 2.18, 2.09) y 15 (δ_{H} 0.87, 0.97).

Estos datos parecen indicar que la única diferencia entre ambas estructuras se encuentra en la estereoquímica de la alanina. Para confirmar la estereoquímica del aminoácido se realizó el método de Marfey.

5.2.4.4 Determinación de la estereoquímica absoluta de bistratamida N (**6**)

La manera de llevar a cabo la determinación de la estereoquímica absoluta fue idéntica que para **5**, con la diferencia que para la estereoquímica de la isoleucina se llevó a cabo mediante el método de Marfey en vez de utilizar el método avanzado de Marfey.

El monitoreo selectivo del ion de relación m/z 342 resultó en la obtención de dos picos con unos t_{R} de 14.3 y 16.8 min que se corresponden con los de L y D-alanina. De igual forma, la monitorización selectiva del ion de relación m/z 384 (isoleucina) presentó un t_{R} de 23.7 min que es idéntico

que para el caso de **5** con lo que se descarta que la diferencia en ambas estructuras esté en la estereoquímica de la isoleucina (Figura 136).

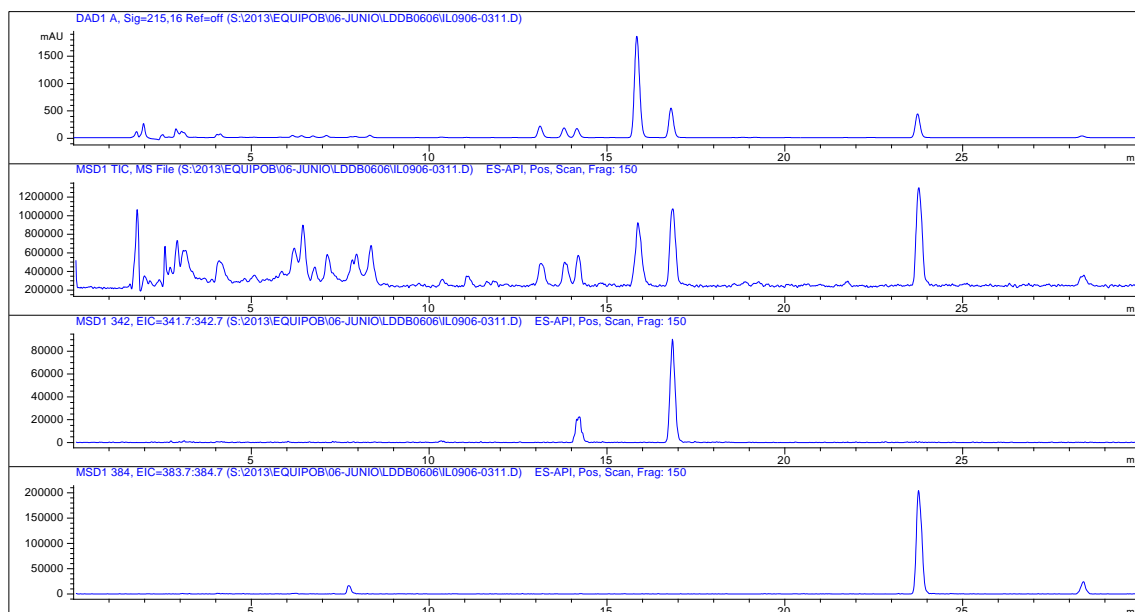


Figura 136. HPLC-MS y monitorización selectiva del ion de relación m/z derivatizados con L-FDAA para alanina e isoleucina.

Por tanto la diferencia debe encontrarse en la estereoquímica de una de las alaninas. Los t_R de los patrones de la alanina son de 14.3 min para L-alanina y de 16.8 min para D-alanina (Figura 137), que corresponden con los t_R obtenidos en la monitorización selectiva del ion de relación m/z 342.

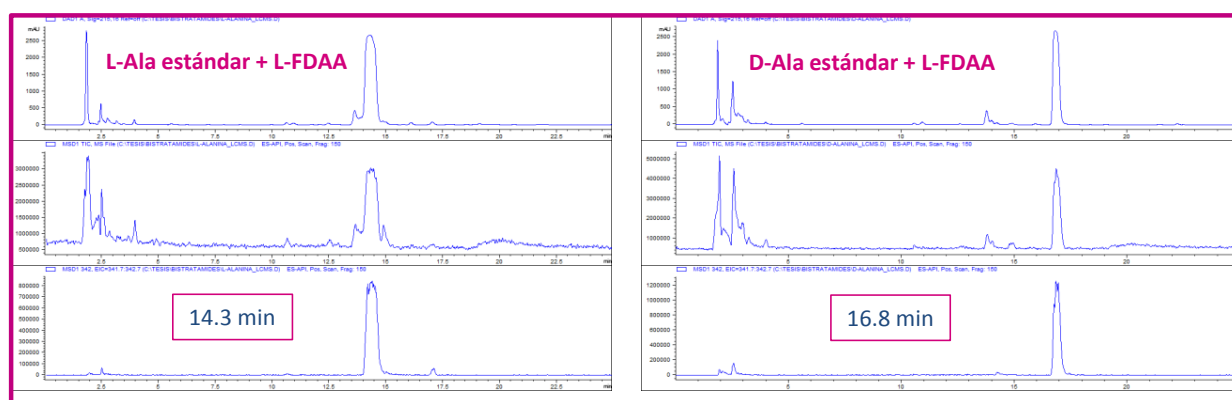


Figura 137. HPLC-MS y monitorización selectiva del ion de relación m/z para L-alanina y D-alanina derivatizadas con L-FDAA.

Se concluyó que **6** presenta dos alaninas, una con la configuración L y otra con D. El siguiente problema fue la localización de cada una de las alaninas en la estructura.

Para la obtención de los aminoácidos libres de los compuestos **5** y **6** es necesario realizar previamente un proceso de ozonólisis para romper los anillos de tiazol. Seguidamente se realiza una hidrólisis para fragmentar los enlaces peptídicos. En el caso de no realizar la ozonólisis, con la hidrólisis se rompen los anillos de oxazol y los enlaces peptídicos, pero los anillos de oxazol quedan intactos.⁸² La metodología empleada fue realizar una hidrólisis a **6** con lo que se obtuvo la alanina unida al anillo de oxazol libre, mientras que siguen unidos los otros dos aminoácidos (alanina e isoleucina) al anillo de tiazol. El producto resultante se derivatizó con L-FDAA y se analizó por HPLC-MS (Figura 138).

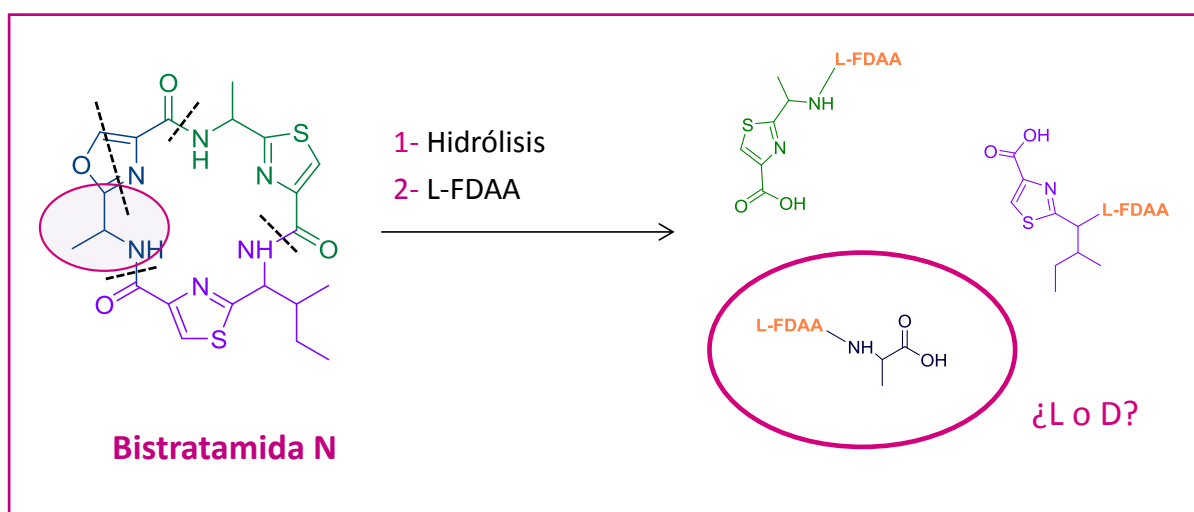


Figura 138. Hidrólisis de bistratamida N (**6**) y posterior derivatización con L-FDAA.

El resultado del análisis confirmó que el tr de la alanina unida al anillo de oxazol correspondía con el tr del patrón de L-alanina. Por lo tanto, la segunda alanina, que está unida al anillo de tiazol, presenta la configuración D (Figura 140). Para determinar la configuración absoluta de

⁸² Banker, R.; Carmeli, S. *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 1248–1251.

la isoleucina, tras ozonólisis, hidrólisis y posterior derivatización con L-FDAA, se comparó el t_R de la isoleucina libre con los t_R de los patrones de isoleucina. Se obtuvo un t_R de 24.0 min que se comparó con los t_R de las cuatro configuraciones de isoleucina: L-Iso (23.9 min), L-*allo*-Iso (24.3 min), D-Iso (24.5 min) y D-*allo*-Iso (24.9 min) (Figura 139). Se concluyó que la estructura presenta el aminoácido L-isoleucina.

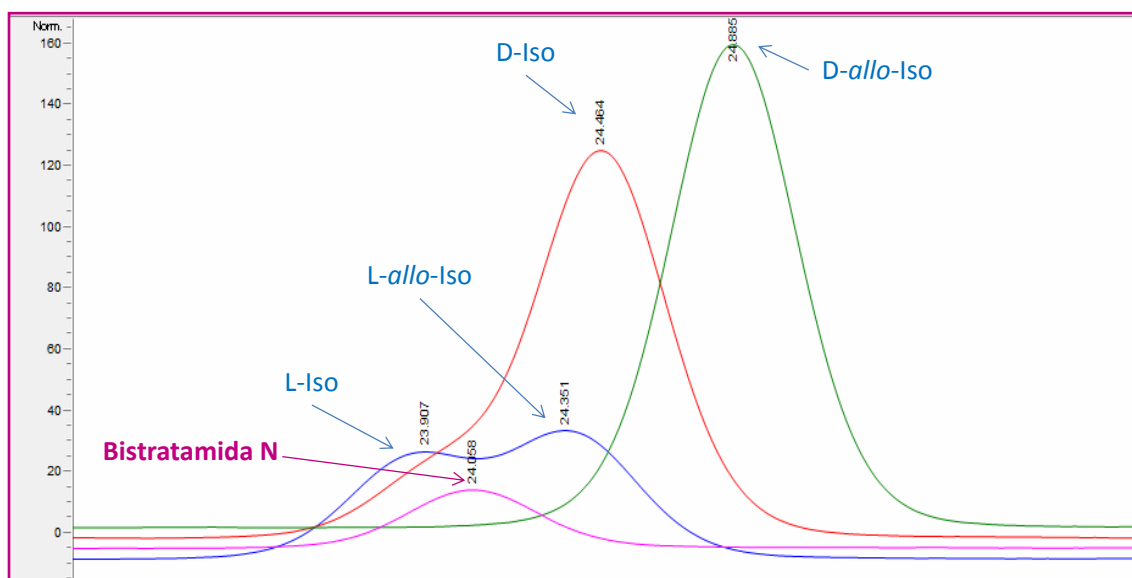


Figura 139. HPLC de las cuatro configuraciones de la isoleucina derivatizadas con L-FDAA y de bistratamida N (**6**) tras ozonólisis, hidrólisis y posterior derivatización con L-FDAA.

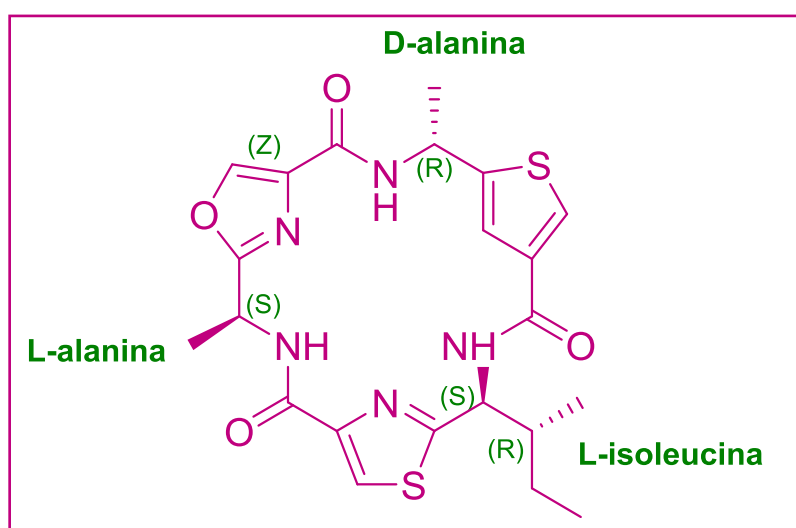


Figura 140. Estructura de bistratamida N (**6**).

5.2.5 Actividad citotóxica de bistratamida A (5) y bistratamida B (6)

Los compuestos **5** y **6** se evaluaron frente a tres distintos tipos de células tumorales humanas: mama (MDA-MB-231), colon (HT-29) y pulmón (NSLC A-549). Ambos compuestos mostraron actividad moderada frente a estas células tumorales.

Tabla 17 . Datos de la actividad citotóxica (μM) de bistratamida A (5) y bistratamida B (6) y doxorubicin.

Compuesto		Línea células tumorales		
		Mama MDA-MB-231	Colon HT-29	Pulmón NSLC A-549
Bistratamida M (5)	GI ₅₀	>20.0	13.0	11.0
	TGI	>20.0	>20.0	>20.0
	LC ₅₀	>20.0	>20.0	>20.0
Bistratamida N (6)	GI ₅₀	18.0	16.0	9.1
	TGI	>20.0	>20.0	>20.0
	LC ₅₀	>20.0	>20.0	>20.0
Doxorubicin	GI ₅₀	0.15	0.27	0.21
	TGI	0.50	0.86	0.85
	LC ₅₀	2.41	>17.2	>17.2

5.2.6 Estudios de interacción de bistratamida K (7) con el ión metálico Zn²⁺

El nivel extremadamente bajo de metales esenciales biológicamente accesibles en el medio marino sugiere que los organismos marinos han desarrollado mecanismos únicos para su adquisición, la retención, y la utilización. Aunque se sabe poco acerca de estos mecanismos, se ha sugerido que los metabolitos secundarios pueden desempeñar un papel esencial.⁸³ Muchos metabolitos secundarios marinos contienen grupos funcionales que pueden formar complejos con metales, pero hay una falta de pruebas si esto se produce in vivo. En 1993 se publicó un review titulado “Marine Metabolites and Metal Ion Chelation: The Facts and the Fantasies”⁸⁴ en el que se indica el potencial de metabolitos marinos para secuestrar y transportar iones metálicos. Además, para entender el rol de los metales no solo se requiere del estudio de los mecanismos de catalisis enzimática por metaloenzimas sino también por que los iones metálicos juegan un papel importante en procesos patofisiológicos y en la perturbación del zinc-finger binding.

En particular, las ascidias del género *Lissoclinum* son una rica fuente de péptidos cíclicos que contienen tanto L como D aminoácidos, encontrándose muchos de ellos modificados en forma de anillos de tiazol, oxazol, tiazolina y oxazolina. Hoy en día existen muchos trabajos que demuestran que estos metabolitos marinos tienen una gran tendencia a quelatar metales.⁸⁵

Estudios de las conformaciones de estos péptidos cíclicos marinos han proporcionado valiosa información sobre los factores que pueden afectar

⁸³ Wright, S. H.; Raab, A.; Tabudravu, J. N.; Feldmann, J.; Long, P. F.; Battershill, C. N.; Dunlap, W. C.; Milne, B. F.; Jaspars, M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 8090–8092.

⁸⁴ Michael, J.P.; Pattenden, G. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1–23

⁸⁵ a) Comba, P.; Dovalil, N.; Gahan, L. R.; Hanson, G. R.; Westphal, M. *Dalt. Trans.* **2014**, *43*, 1935–1956.
b) Bertram, A.; Pattenden, G. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 18–30.

a las reactividades y la biología de estos metabolitos secundarios. Se han determinado dos conformaciones para este tipo de péptidos: la conformación cuadrada y la conformación de figura de 8 retorcida (Figura 141).

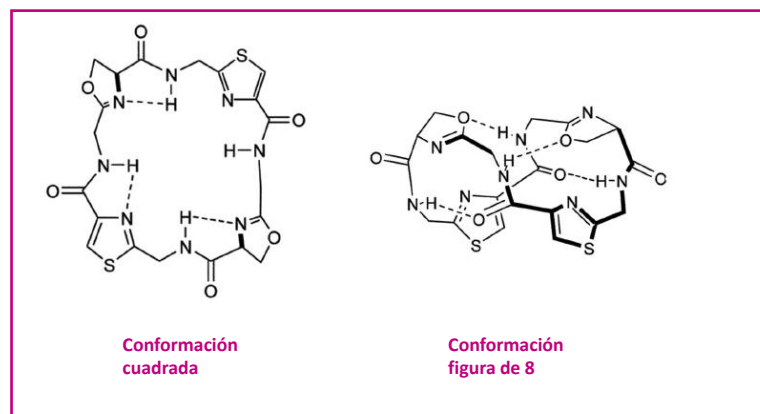


Figura 141. Conformaciones posibles para péptidos cíclicos: cuadrada y figura de 8.

La ascidiacyclamida presenta una conformación cuadrada en la que los anillos de tiazol y oxazol ocupan las esquinas de un rectángulo. Esta misma conformación está presente en la patellamide A, pero, por el contrario, la patellamide D presenta una conformación de figura de 8 debido a enlaces de hidrógeno intramoleculares y a interacciones entre los anillos de tiazol (π -stacking).⁸⁶

En 1994, Gahan y col,⁸⁷ fueron los primeros en caracterizar mediante cristalografía de rayos X un complejo de bis- cobre (II). Los iones de cobre en este complejo están coordinados a tres nitrógenos, a una amida desprotonada y a dos moléculas de agua. Esta afinidad de la ascidiacyclamida por el cobre sugiere que estos complejos entre el metal y

⁸⁶ Bertram, A.; Pattenden, G. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, 24, 18–30.

⁸⁷ Van den Brenk, A. L.; Byriel, K. A.; Fairlie, D. P.; Gahan, L. R.; Hanson, G. R.; Hawkins, C. J.; Jones, A.; Kennard, C. H. L.; Moubaraki, B.; Murray, K. S. *Inorg. Chem.* **1994**, 33, 3549–3557.

los péptidos cíclicos están involucrados en la activación y transporte de CO_2 *in vivo* para procesos bioquímicos específicos.

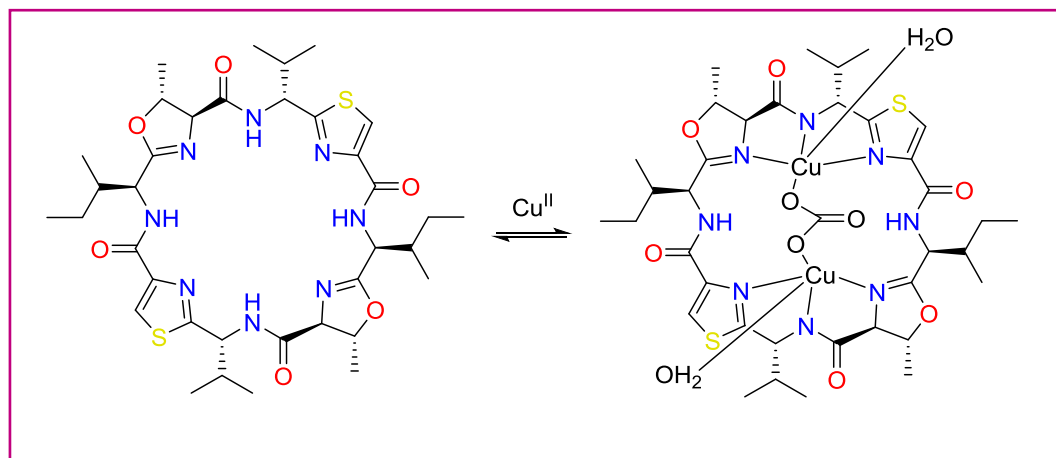


Figura 150. Complejo de bis-cobre (II) de ascidiacyclamida.

Un gran número de estudios han sido realizados sobre el comportamiento de los péptidos cíclicos aislados de *Lissoclinum*. Las patellamidas A, B y E forman complejos estables con Zn^{2+} y Cu^{2+} pero por el contrario, presentan poca afinidad por metales como el Mg^{2+} y Ca^{2+} .⁸⁸

Recientemente, Jaspars y col.⁸⁹ estudiaron la afinidad de las patellamidas A y C con los iones de Cu^{2+} y Zn^{2+} , y encontrando que la patellamida C muestra una gran afinidad por el cobre que la patellamida A. Esta característica se atribuye a la capacidad de la patellamida C de ajustar su conformación de figura de 8 a cuadrada para acomodar al metal. Se demostró que la patellamida C no se coordina con los iones Zn^{2+} y mantiene su conformación de figura de 8. Sin embargo, cuando se añade iones de Cu^{2+} el péptido cíclico cambia su conformación a cuadrada. Repitiendo el mismo experimento con la patellamida A, se observó que no presenta preferencia por ninguno de los dos metales, lo que sugiere que la

⁸⁸ Freeman, D. J.; Pattenden, G.; Drake, A. F.; Siligardi, G.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1998**, 129-136.

⁸⁹ Comba, P.; Dovalil, N.; Gahan, L. R.; Hanson, G. R.; Westphal, M. *Dalt. Trans.* **2014**, 43, 1935-1956.

falta de afinidad puede estar asociada a la disponibilidad de los puntos de unión entre el nitrógeno y los iones de Cu^{2+} y Zn^{2+} en la disposición cuadrada. El zinc prefiere una disposición tetraédrica de los centros de nitrógeno para la unión y cuando los tres átomos de nitrógeno están orientados para unirse al zinc, el esqueleto de la patellamida adopta una conformación cuadrada. Sin embargo, el cobre prefiere una disposición piramidal cuadrada de los ligandos para coordinarse, lo cual es solo posible cuando la patellamide adquiere una conformación cuadrada. Cuando el esqueleto de la patellamida es distorsionado a la conformación de figura de 8, como ocurre con la patellamida C, sólo dos centros de nitrógenos están disponibles para la unión a los iones de Zn^{2+} y necesariamente el péptido cíclico muestra selectividad por los iones de Cu^{2+} .

En 2013, nuestro equipo de investigación de Pharmamar, aisló otros dos miembros de la familia de las bistratamidas: K (**7**) (Figura 144) y L.⁹⁰ Debido al interés relacionado con la coordinación de metales con estos tipos de péptidos cíclicos, se realizó un estudio de coordinación de la bistratamida K con iones de Zn^{2+} . El compuesto **7** presenta un fórmula molecular de $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}_2$ y sus datos de RMN de ^{13}C (Figura 143) y ^1H (Figura 144) se muestran en la tabla 21.

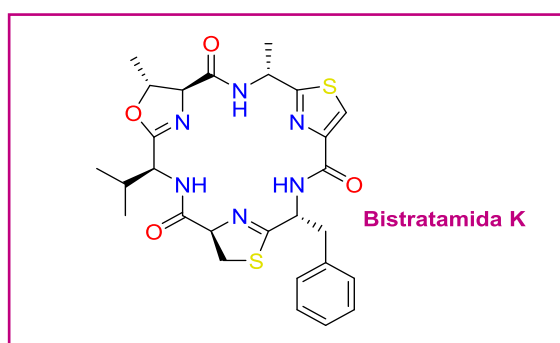
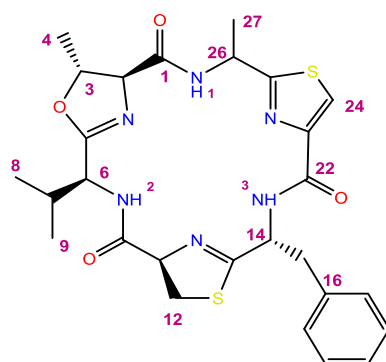


Figura 142. Estructura de bistratamida K (**7**).

⁹⁰ Urda, C.; Gómez, E.; Reyes, F.; García-Cerezo, A.; Tanaka, J.; de Eguilior, C.; Bueno, S.; Cuevas, C. **2013**, P 184. 14th Symposium on Marine Natural Product / 8th European Conference on Marine Natural Products.

Tabla 18. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C (500 MHz, CD_3CN) de bistratamida K (7).

Position	δ_{C}	δ_{H}	Position	δ_{C}	δ_{H}
1	170.6		16	136.8	
2	74.5	4.19	17	130.8	7.18
3	81.6	4.83	18	129.1	7.25
4	24.3	1.53	19	127.9	7.24
5	168.5		20	129.1	7.25
6	52.3	4.62	21	130.8	7.18
7	32.1	2.05	22	160.0	
8	15.8	0.40	23	149.8	
9	19.0	0.69	24	125	8.06
10	170.7		25	172.6	
11	78.6	5.01	26	48.0	5.25
12	37.8	3.63, 3.71	27	24.3	1.52
13	174.6		NH-1		7.86
14	53.7		NH-2		7.19
15	40.4		NH-3		8.12

**Bistratamida K**

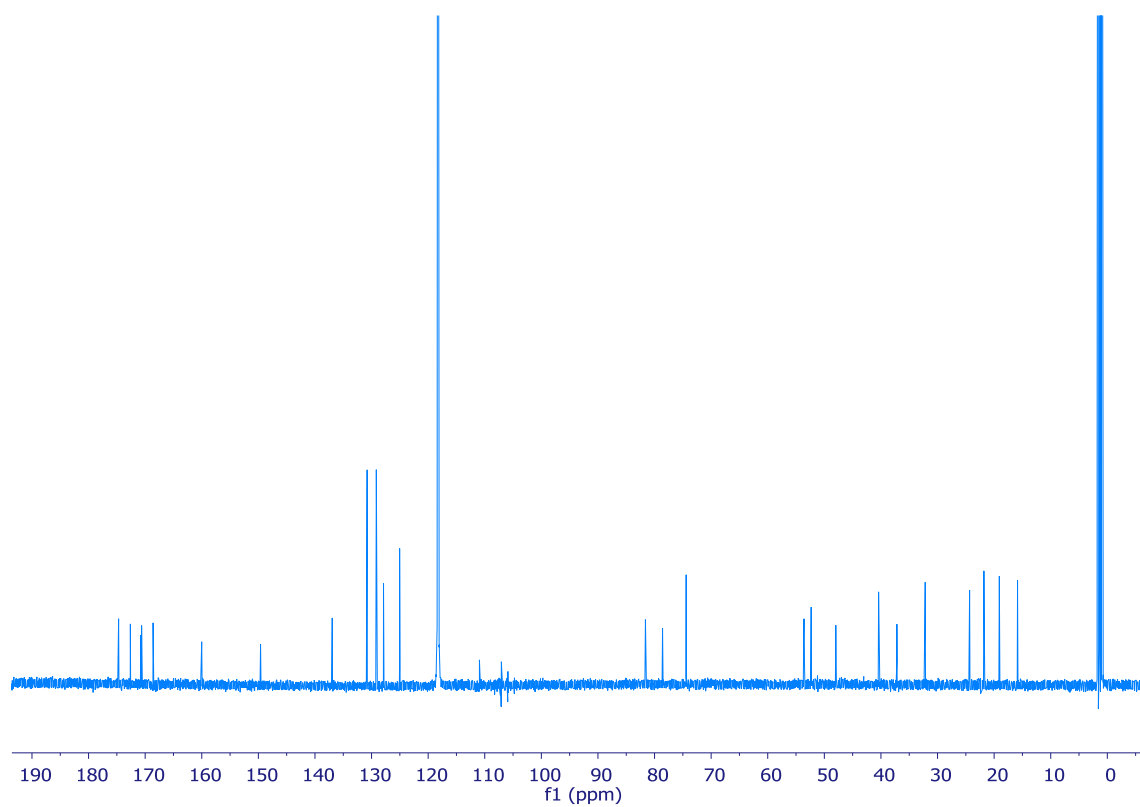


Figura 143. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3CN) de bistratamida K (7).

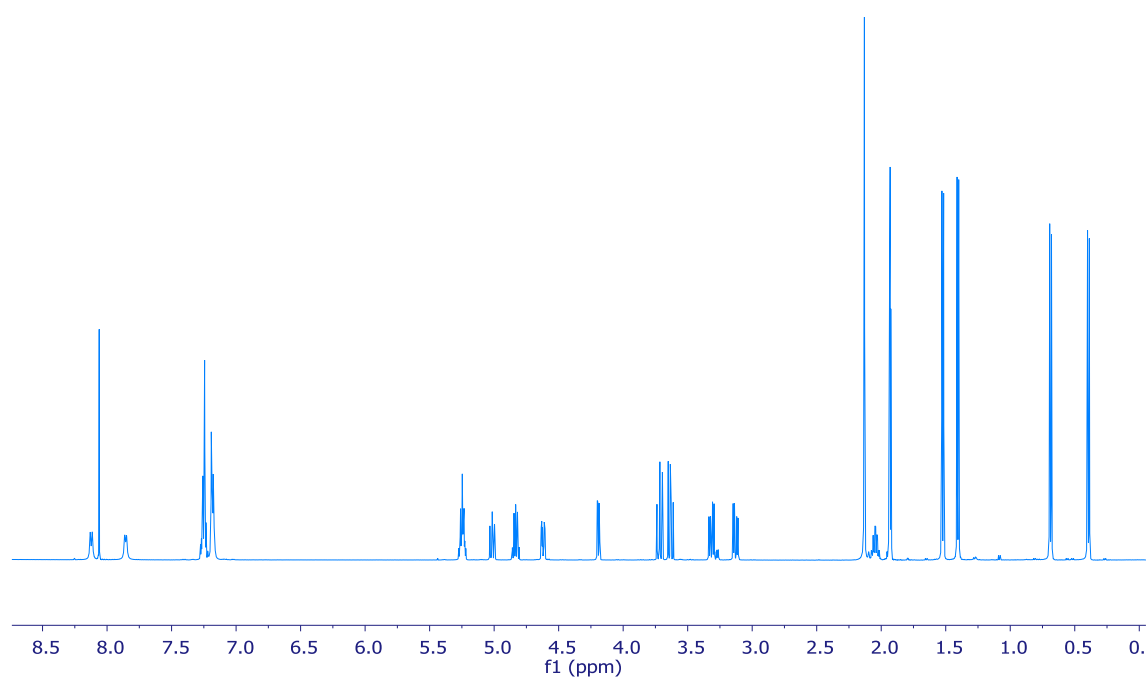


Figura 144. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3CN) de bistratamida K (7).

Se realizó una tritación utilizando una disolución de ZnCl_2 en CD_3CN y se añadió de 0.2 en 0.2 equivalentes a un tubo de RMN en que previamente se añadió 3 mg de (**7**) en CD_3CN .

El proceso de coordinación de siguió por RMN de ^{13}C . Se realizaron experimentos desde 0 equivalentes hasta llegar hasta los 4 equivalentes de ZnCl_2 , en donde se observó que no se producía cambios en las señales (Figura 145).

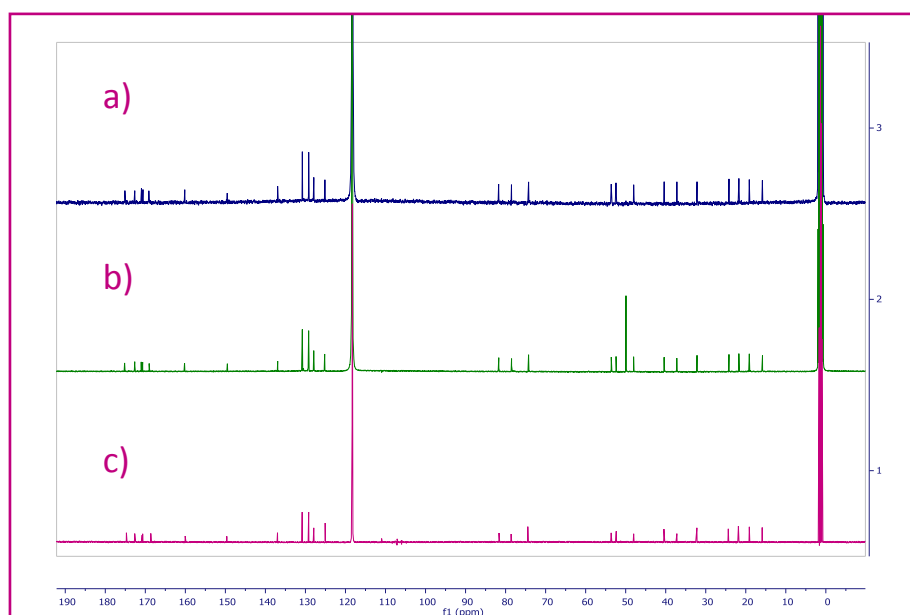


Figura 145. a) RMN ^{13}C de **7** (4 eq), b) RMN ^{13}C de **7** (2 eq) y c) RMN ^{13}C de **7** (0 eq).

Según el trabajo de Comba y col.⁹¹ en muchos péptidos cíclicos de este tipo como la westiellamida y tres de sus análogos, la unión con el ión de Cu^{2+} se realiza a través de una geometría piramidal con Nitrógeno (ciclo)-Nitrógeno (amida)-Nitrógeno (ciclo). En nuestro caso, la desprotonación del nitrógeno de la amida no se produce debida a que no desaparece la señal de NH correspondiente (Figura 146). Por lo tanto, el Zn^{2+} no se coordina a través del nitrógeno de la amida como ocurre en el trabajo desarrollado por Comba.

⁹¹ Comba, P.; Dovalil, N.; Gahan, L. R.; Hanson, G. R.; Westphal, M. *Dalt. Trans.* **2014**, 43, 1935–1956.

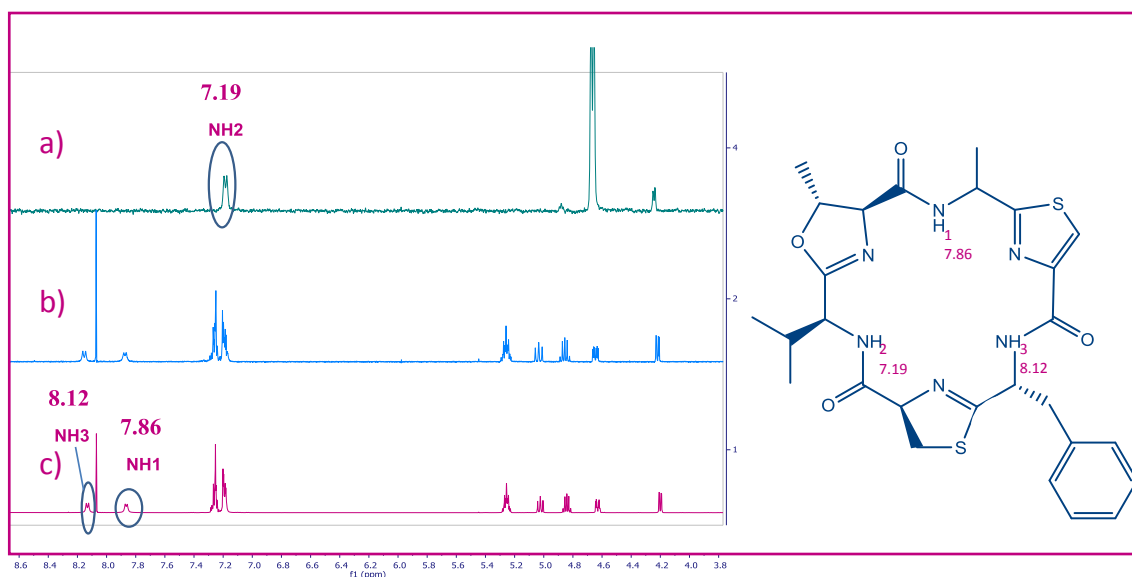


Figura 146. Estructura y ampliación del espectro de RMN ^1H de **7**: a) TOCSY sobre señal a 4.66 ppm (H-6) de **7** (4 eq), b) RMN ^1H de **7** (4 eq) y c) RMN ^1H de **7** (0 eq).

Los cambios observados en el espectro de RMN de ^{13}C de bistratamida K (**7**) al adicionar el ZnCl_2 se encontraron en las señales con un desplazamiento químico a 168.5, 170.7 y 174.6 ppm, que corresponden a las posiciones 5, 10 y 13 respectivamente, lo que parece indicar que estas son las posiciones por donde se coordina el Zn^{2+} . Estos cambios si están de acuerdo con los estudios publicados por Gahan y col,⁹² en donde un complejo de potasio del octapéptido cíclico ascidiacyclamida 10 muestra que el ión K^+ se une a dos átomos de nitrógeno de los anillos de tiazol y a un oxígeno de uno de los carbonilos de los grupos amida adyacentes.

⁹² Van den Brenk, A. L.; Fairlie, D. P.; Gahan, L. R.; Hanson, G. R.; Hambley, T. W. *Inorg. Chem.*, **1996**, 35, 1095–1110.

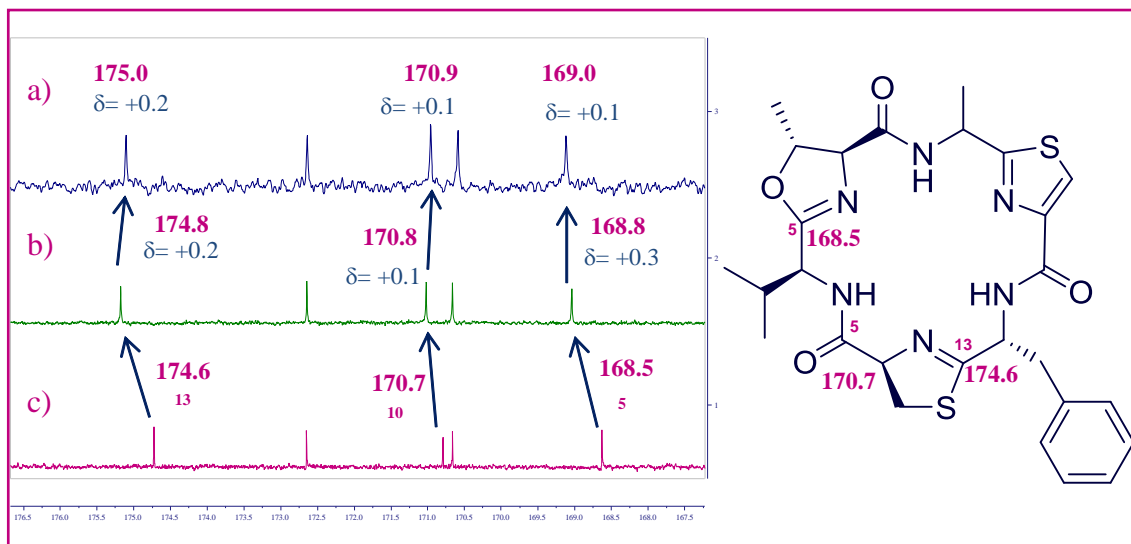


Figura 147. Estructura y ampliación del espectro de RMN ^{13}C de **7**: a) RMN ^{13}C de **7** (4 eq), b) RMN ^{13}C de **7** (2 eq) y c) RMN ^{13}C de **7** (0 eq).

Con el fin de obtener la estructura del complejo de Zinc de **7**, se realizó un estudio más exhaustivo por espectroscopía de masas. Mediante el análisis de patrones de isótopo se asignó los componentes del complejo. Los principales iones cluster detectados en el espectro de masas de **7** después de la adición de 4 equivalente de Zn^{2+} , junto con los correspondientes patrones isotópicos calculados se muestran en la Figura 158. Así, el grupo de iones observado a m/z 649 se asignó a un complejo mononuclear Zn^{2+} de **7** que se coordina adicionalmente a un grupo OH. La pérdida de 18 unidades que dio lugar al cluster de iones detectado a m/z 631 que se corresponde además como el pico base, podría deberse a la pérdida de una molécula de agua.

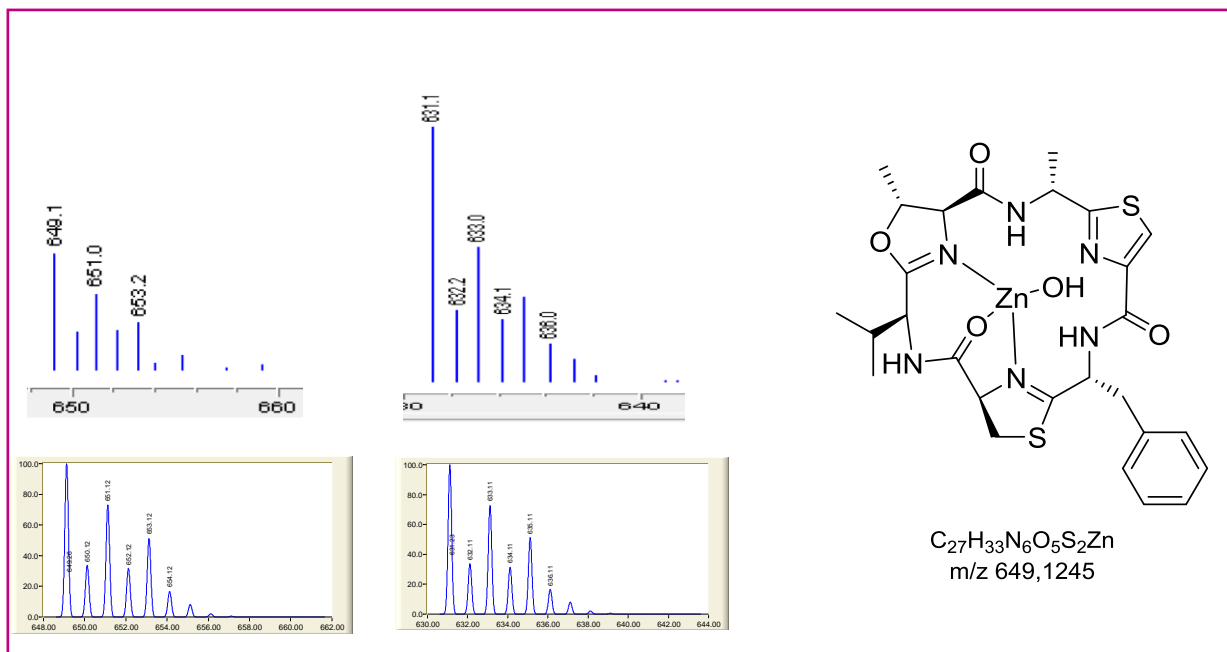


Figura 148. Clusters isotópicos experimental (arriba) y calculado (debajo) del compuesto **7** después de la adición de 4 equiv de $ZnCl_2$ y estructura propuesta para el complejo mononuclear de Zn^{2+} de **7**.

Para confirmar la estructura del complejo sería necesario cristalizarlo y realizar a continuación un estudio por difracción por rayos X. Desafortunadamente debido a la poca cantidad que se dispone no se pudo llevar a cabo.

5.3 Conclusiones

En resumen, se aislaron dos nuevos hexapéptidos cíclicos de la ascidia *Lissoclinum bistratum*, bistratamidas M (**5**) y N (**6**). El análisis de los datos de NMR y MS junto con el método de Marfey se utilizó para la determinación de sus estructuras planas y configuraciones absolutas, caracterizándose por la presencia de anillos de oxazol y tiazol. Estos péptidos cíclicos muestran una actividad citotóxica moderada contra cuatro líneas celulares tumorales humanas. Además, el estudio de la interacción del ion Zn^{2+} con otro hexapéptido cíclico, bistratamida K (**7**), aislado del mismo organismo, indicó la formación de un complejo Zn^{2+} mononuclear de **7** a partir del espectro de RMN y su confirmación por experimentos de ESI-TOFMS. Estos resultados proporcionan más información a cerca de las interacciones entre los metales y los péptidos cíclicos que se encuentran en ascidias.⁹³

Este trabajo dio como resultado un manuscrito que ha sido enviado para su publicación.

⁹³ Michael, J. P.; Pattenden, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, 32, 1-23.



Capítulo 6: Estudio químico
de la esponja
Daedalopelta sp.

CAPITULO 6: ESTUDIO QUÍMICO DE LA ESPONJA *Daedalopelta* sp.

6.1 Antecedentes

La clasificación taxonómica fue realizada por la Dra. María Jesús Uriz (Centro de Estudios Avanzados de Blanes (CEAB, España) encuadrando el organismo recolectado dentro del género *Daedalopelta* sp. perteneciente al filo Porífera, clase Demospongiae, cubclase Heteroscleromorpha, orden Tetractinellida, suborden Astrophorina y familia *Neopeltidae*.⁹⁴ (Figura 149).

Filo	Clase	Subclase	Orden	Suborden	Familia	Género
<u>Porifera</u>	Porifera incertae sedis <u>Demospongiae</u> Hexactinellida Homoscleromorpha Calcarea	<u>Heteroscleromorpha</u> Keratosa Verongimorpha	Agelasida	Astrophorina Spirophorina	<i>Calthropellidae</i>	<i>Callipelta</i> <i>Daedalopelta</i> <i>Neopelta</i> <i>Homophymia</i>
			Axinellida		<i>Ancorinidae</i>	
			Biemnida		<i>Corallistidae</i>	
			Bubarida		<i>Geodiidae</i>	
			Clionaida		<i>Isoraphiniidae</i>	
			Polymastiida		<i>Macandrewiidae</i>	
			Haplosclerida		<i>Neopeltidae</i>	
			Heteroscleromorpha incertae sedis		<i>Pachastrellidae</i>	
			Merliida		<i>Phymaraphiniidae</i>	
			Poecilosclerida		<i>Phymatellidae</i>	
			Desmacellida		<i>Vulcanellidae</i>	
			Scopalínida		<i>Theneidae</i>	
			Sphaerocladina		<i>Theonellidae</i>	
			Trachycladida		<i>Thoosidae</i>	
			Suberitida		<i>Thrombidae</i>	
			Tethyida		<i>Pleromidae</i>	
			Tetractinellida			
			Spongillida			

Figura 149. Clasificación taxonómica del género *Daedalopelta*.

⁹⁴ World Register of Marine Species (www.marinespecies.org)

Los péptidos aislados de esponjas marinas constituyen un grupo muy importante de productos naturales bioactivos. Algunos ejemplos son las mirabamides A-H⁹⁵ aisladas de *Siliquariaspongia mirabilis*, las papuamidas A-F⁹⁶ y theopapuamidas⁹⁷ aisladas de *Theonella mirabilis* y *T. Swinhoei*, respectivamente, las neamphamidas A-B⁹⁸ aisladas de *Neamphius huxleyi* y stellatolidas A-G aisladas de *Ecionemia acervus*.⁹⁹

Todos estos péptidos se caracterizan por poseer en sus estructuras la presencia de uno o más aminoácidos inusuales como son 3,4-dimetilglutamina (3,4-diMeGln), β -metoxitirosina (β OMeTyr), ácido 4-amino-7-guanidinio-2,3-dihidroxiheptapentanoico (Agdha), ácido 3-hidroxi-2,4,6-trimetilheptanoico (Htmha), ácido pipercolico (Pip), ácido 3-hidroxi-2,4,6-trimetiloctanoico (Htmoa), ácido 4-amino-2,3-dihidroxi-1,7-heptandioico (Adha) y ácido 2-amino-3-hidroxi-4,5-dimetilhexanoico (Ahdmha) (Figura 150).

⁹⁵ (a) Plaza, A.; Gustchina, E.; Baker, H. L.; Kelly, M.; Bewley, C. A. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1753–1760. (b) Lu, Z. Y.; Van-Wagoner, R. M.; Harper, M. K.; Baker, H. L.; Jooper, J. N. A.; Bewley, C. A.; Ireland, C. M. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 185–193.

⁹⁶ Ford, P. W.; Gustafson, K. R.; McKee, T. C.; Shigematsu, N.; Maurizi, L. K.; Panneel, L. K.; Williams, D. E.; de Silva, E. D.; Lassota, P.; Allen, T. M.; Van Soest, R.; Andersen, R. J.; Boyd, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5899–5909. (b) Prasad, P.; Aalbersberg, W.; Feussner, K. D.; Wagoner, R. M. V. *Tetrahedron.* **2011**, *67*, 8529–8531.

⁹⁷ (a) Ratnayake, A. S.; Bugni, T. S.; Feng, X. D.; Harper, M. K.; Skalicky, J. J.; Mohammed, K. A.; Andjelic, C. D.; Barrows, L. R.; Ireland, C. M. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1582–1586. (b) Plaza, A.; Bifulco, G.; Keffer, J. L.; Lloyd, J. R.; Beker, H. L.; Bewley, C. A. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 504–512.

⁹⁸ (a) Oku, N.; Gustafson, K. R.; Cartner, L. K.; Wilson, J. A.; Shigematsu, N.; Hess, S.; Panell, L. K.; Boyd, M. R.; McMahon, J. B. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1407–1411. (b) Yamano, Y.; Arai, M.; Kobayashi, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4877–4881.

⁹⁹ Martín, M. J.; Rodríguez-Acebes, R.; García-Ramos, Y.; Martínez, V.; Murcia, C.; Digón, I.; Marco, I.; Pelay-gimeno, M.; Fernández, R.; Reyes, F.; Albericio, F.; Cuevas, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 6754–6762.

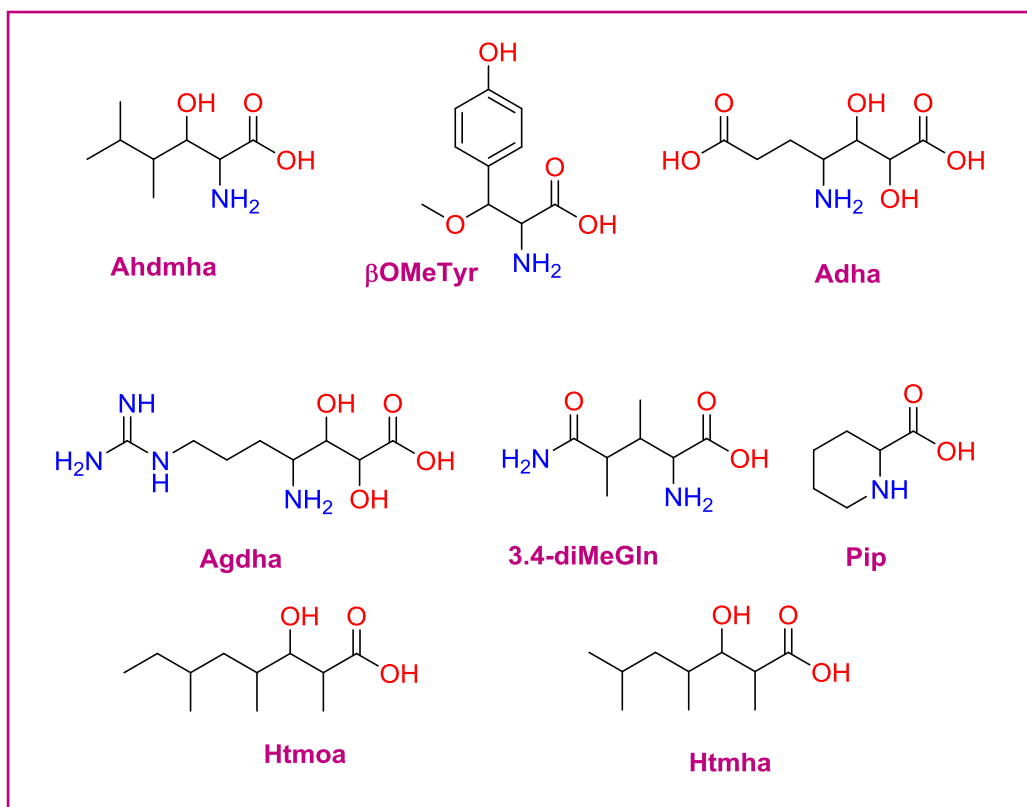


Figura 150. Estructuras de Ahdmha, BOMeTyr, Adha, Agdha, 3,4diMeGln, Pip, Htmoa y Htmha.

Adicionalmente, la mayoría de estos péptidos comparten un esqueleto común que comprende un macrociclo desipéptido de siete u ocho aminoácidos los cuáles están unidos a una cadena formada por tres o cuatro residuos.

El estudio de las esponjas pertenecientes a la familia *Neopeltidae* se inició en el año 1996 cuando Zampella, D'Auria y col. aislaron y caracterizaron los depsipéptido cíclicos lque se denominaron callipeltinas A-C.¹⁰⁰⁻¹⁰¹ Presentan actividad citotóxica *in vitro*, siendo callipeltina A y B más activos que callipeltina C, lo que indica la importancia del macrociclo en la bioactividad. Además, callipeltina A muestra actividad anti-VIH.

¹⁰⁰ Zampella, A.; Auria, M. V. D.; Paloma, L. G.; Casapullo, A.; Minale, L.; Henin, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6202–6209.

¹⁰¹ Valeria D'Auria, M.; Zampella, A.; Paloma, L. G.; Minale, L.; Debitus, C.; Roussakis, C.; Le Bert, V. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 9589–9596.

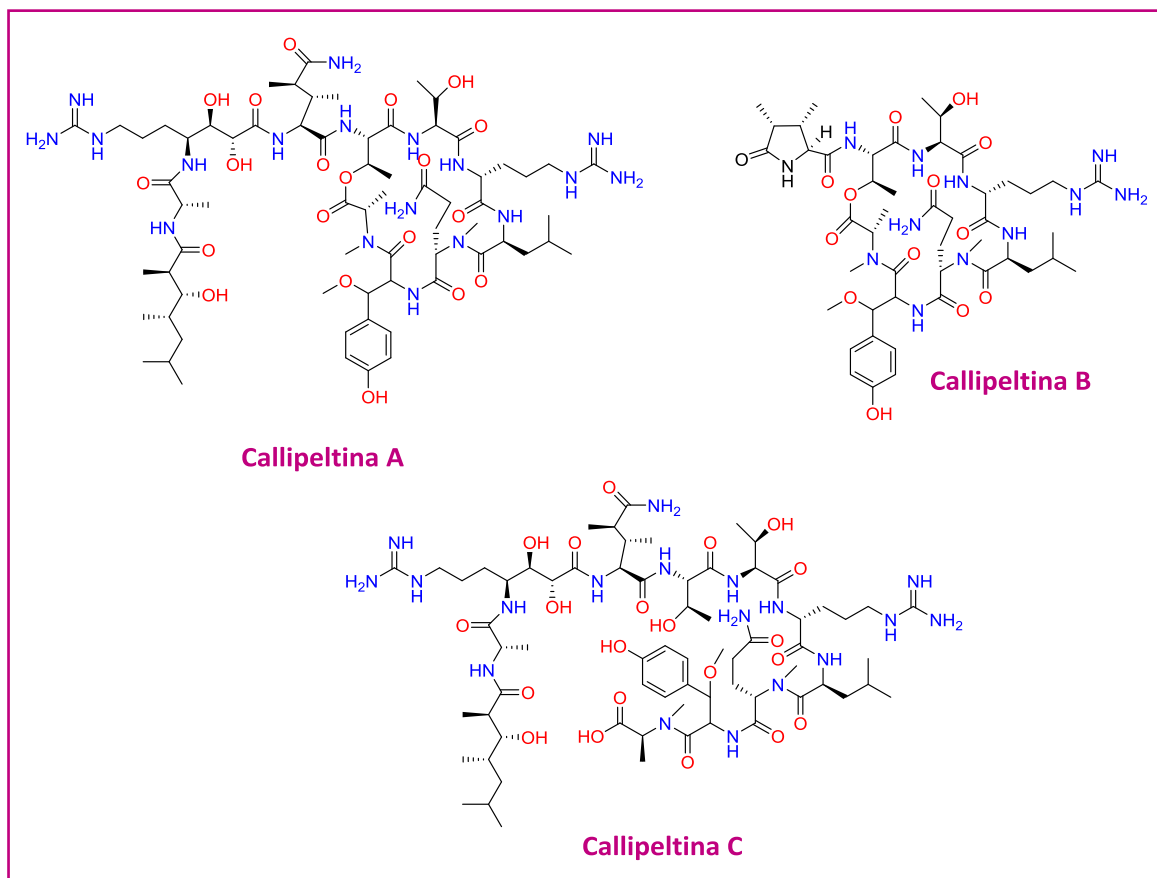


Figura 151. Estructuras de callipeltinas A-C.

Ese mismo año, los mismos autores publicaron el aislamiento de callipeltosido A, un macrociclo glicosilado con actividad citotóxica con un IC_{50} de 11.26 $\mu\text{g/mL}$ para células cancerígenas de pulmón.¹⁰² Este mismo grupo de investigación reportó un año más tarde dos nuevos análogos, los callipeltosidos B y C.¹⁰³

¹⁰² Zampella, A.; Auria, M. V. D.; Minale, L.; Uni, V. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11085–11088.

¹⁰³ Zampella, A.; Auria, M. V. D.; Minale, L.; Naturali, S.; Federico, N. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 3243–3248.

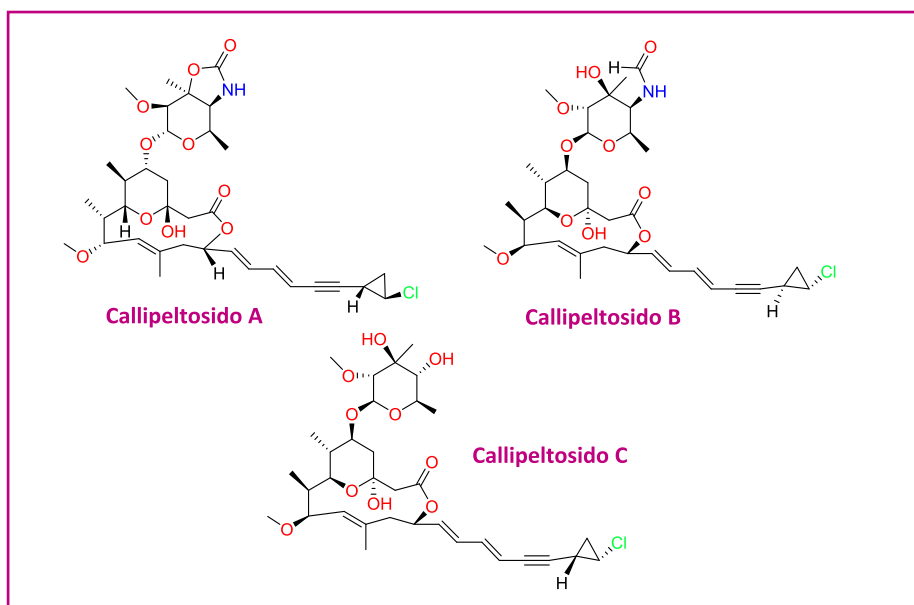


Figura 152. Estructuras de callipeltosidos A-C.

El macrólido neopeltolido fue reportado en 2007 y posee una fuerte actividad citotóxica con valores de IC_{50} de 1.2 nM y de 5.1 nM para cáncer de pulmón y de ovario respectivamente.¹⁰⁴

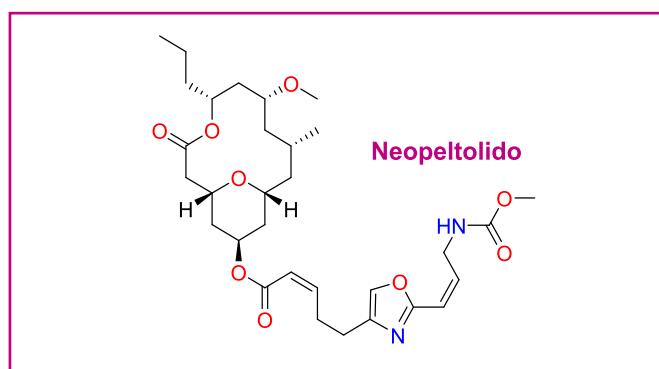


Figura 153. Estructura de neopeltolido.

Finalmente, el equipo de investigación de PharmaMar aisló y caracterizó en 2014 dos nuevos depsipéptidos cíclicos denominados pipecolidepsinas A y B.¹⁰⁵ Muestran actividad citotóxica frente a células tumorales humanas de pulmón, colon y mama con valores de GI_{50} del rango micromolar.

¹⁰⁴ Wright, A. E.; Botelho, J. C.; Guzman, E.; Harmody, D.; Linley, P.; McCarthy, P. J.; Pitts, T. P.; Pomponi, S. A.; Reed, J. K.; Pierce, F. J. *Nat. Prod.* **2007**, 70, 412–416.

¹⁰⁵ Coello, L.; Reyes, F.; Martín, M. J.; Cuevas, C.; Fernández, R. J. *Nat. Prod.* **2014**, 77, 298–303.



Figura 154. Estructuras de pipecolidepsinas A y B.

6.2 Resultados y discusión

6.2.1 Identificación y clasificación

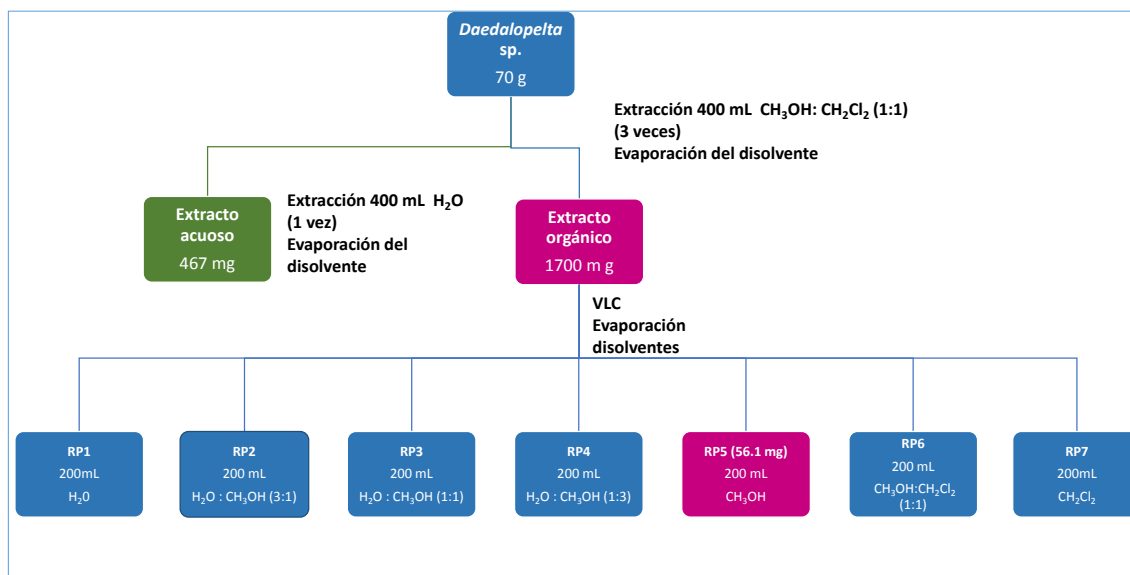
La esponja *Daedalopelta* sp. fue recolectada a mano y congelada inmediatamente por el Departamento de Expediciones de PharmaMar en la isla de Alor, Indonesia. Fue codificada y depositada en PharmaMar con el código ORMA123604.



Figura 155. Fotografía de la esponja *daedalopelta* sp. y localización de la región donde fue recolectada.

6.2.2 Extracción y fraccionamiento

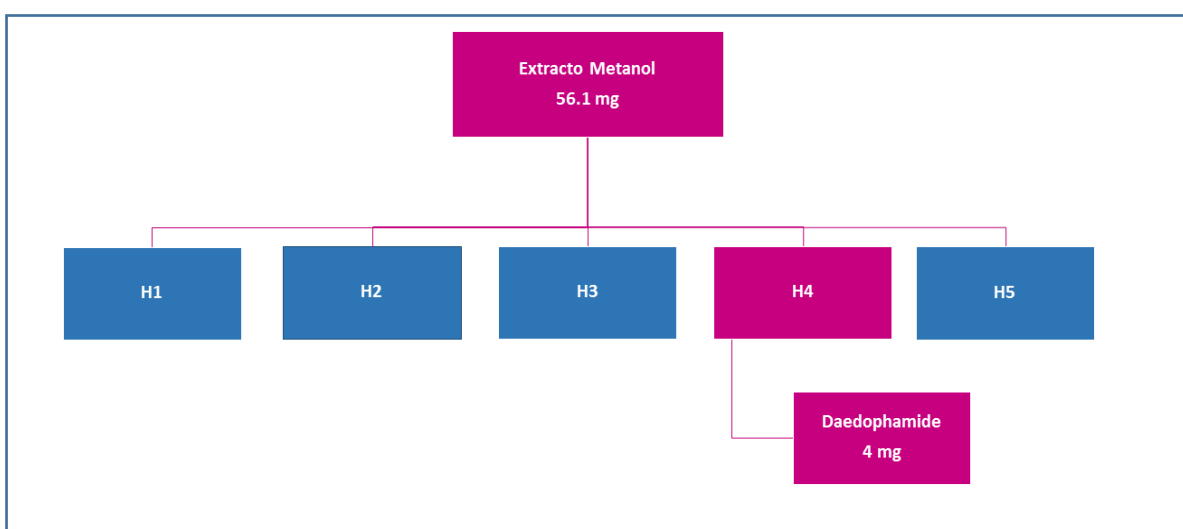
Con el fin de extraer los metabolitos secundarios causantes de la actividad, la esponja se trozó y se extrajo posteriormente varias veces con metanol. El extracto metanólico se fraccionó entre distintas mezclas de disolventes en orden creciente de polaridad, aprovechándose así el distinto coeficiente de reparto que presentan los componentes de los extractos orgánicos en cada uno de los sistemas de disolventes (ver Esquema 8).



Esquema 8. Fraccionamiento del extracto orgánico de la esponja *daedalopelta* sp.

6.2.3 Aislamiento y purificación

La fracción activa RP5 se separó mediante cromatografía de HPLC obteniéndose 5 fracciones. El bioensayo de las fracciones obtenidas mostró que la fracción H4 era la única que mostraba actividad citotóxica. La posterior purificación de nuevo por HPLC de dicha fracción permitió aislar un compuesto puro que se denominó daedophamida (**8**).



Esquema 9. Esquema de aislamiento de daedophamide (**8**) de la fracción eluída con metanol RP5.

6.2.4 Determinación estructural

6.2.4.1 Determinación de la estructura plana de daedophamida (**8**)

El espectro de alta resolución (+)-HRESI-TOFMS muestra unos iones con una relación m/z de 1596.9328 ($[M+H]^+$) y de m/z 798.9793 ($[M+H]^{+2}$) que corresponde con la fórmula molecular $C_{71}H_{125}N_{19}O_{22}$ (1596.8663). La formación del ión doblemente cargado sugiere la presencia en la estructura de un grupo guanidinio.¹⁰⁶ El análisis el espectro de RMN ^{13}C muestra la presencia de 71 señales, siendo 17 de ellas atribuibles a grupos carbonilo con los siguientes desplazamientos químicos: δ_c 180.2, 178.9, 177.8, 176.5, 176.4, 176.3, 174.5, 174.3, 173.1, 173.1, 172.7, 171.3, 171.2, 171.1, 170.8, 158.6 y 158.5 ppm. Los desplazamientos de estos carbonos junto a las 14 señales que se observan entre 46.8 y 62.0 ppm, características de carbonos en posición α en residuos de aminoácidos, indican la naturaleza peptídica. Adicionalmente, se observa la presencia de cinco señales entre 71.4 y 79.5 ppm correspondientes a carbonos oxigenados, y finalmente, 35 señales entre 14.4 y 44.8 ppm pertenecientes a cadenas carbonadas alifáticas.

La naturaleza peptídica también se hizo evidente por los espectros de RMN 1H de **8**. La presencia de cuatro señales intercambiables con deuterio que resonaron a 6.45, 7.58, 8.27 y 8.37 ppm y que desaparecen con el tiempo, se asignaron a cuatro grupos NH. Los desplazamientos característicos de protones en la posición α de los aminoácidos se observan en el espectro de protón en la zona entre 4.05 y 5.80 ppm. Dos señales singuletes a 3.04 y 3.28 ppm se asignaron a un grupo *N*-metilo y a un grupo *O*-metilo, respectivamente. Finalmente, se observaron 11

¹⁰⁶ Oku, N.; Gustafson, K. R.; Cartner, L. K.; Wilson, J. A.; Shigematsu, N.; Hess, S.; Pannell, L. K.; Boyd, M. R.; McMahon, J. B. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 1407–1411.

señales de grupos metilos que resuenan como dobletes entre 0.88 y 1.43 ppm.

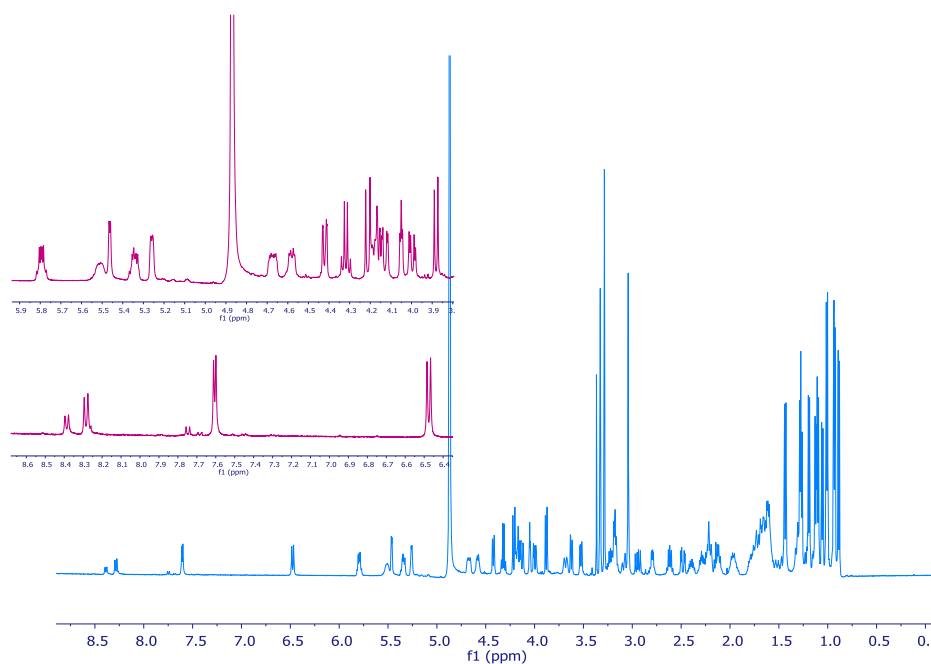


Figura 156. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) y ampliación de las señales correspondientes a los H α de daedophamida (**8**).

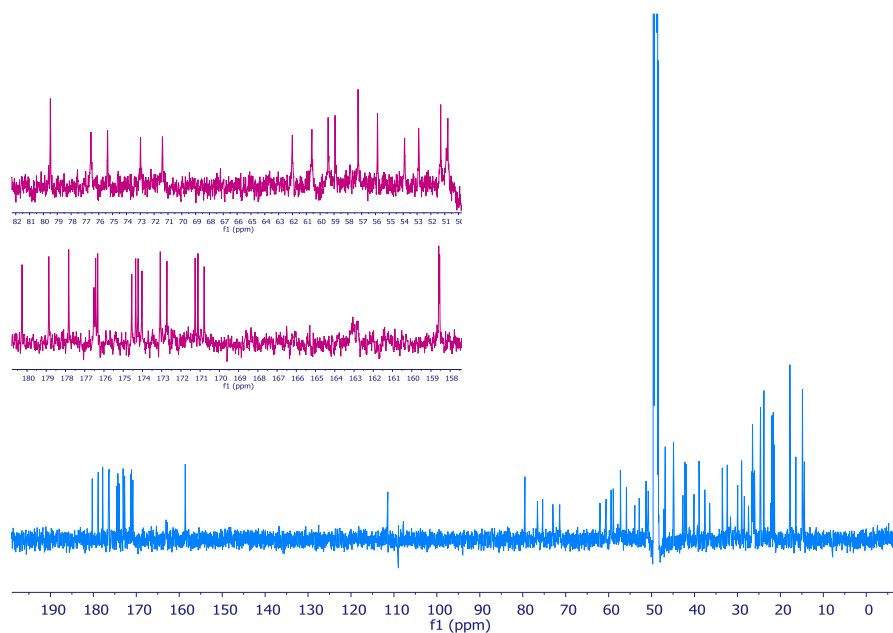
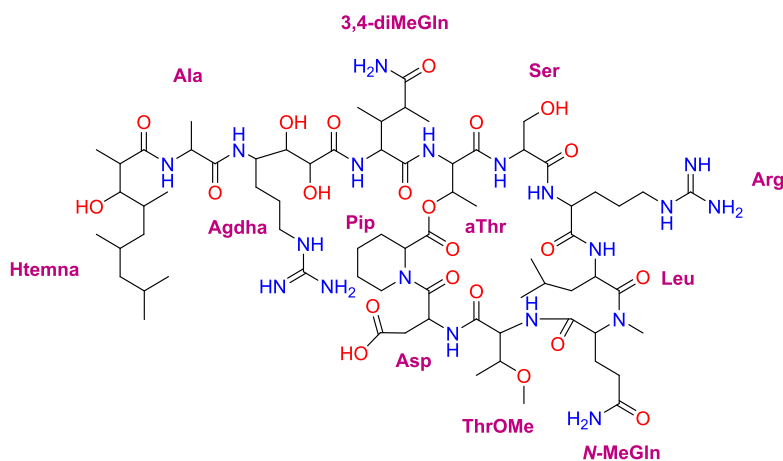


Figura 157. Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, CD_3OD) de daedophamida (**8**) y ampliación de las señales correspondientes a los grupos carbonilos y los carbonos en posición en α .

Tabla 19. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C (500 MHz, CD_3OD) de daedophamida (**8**).

Residuo	δ_{C} , tipo	δ_{H} , mult. (J in Hz)	Residuo	δ_{C} , tipo	δ_{H} , mult. (J in Hz)
Htemna			Arg		
1	178.9, C		1	174.3, C	
2	44.8, CH	2.61, dd (8.8, 6.6)	2	52.8, CH	4.57, dd (10.1, 4.1)
2-CH ₃	17.8, CH ₃	1.01, d (6.6)	3	28.4, CH ₂	1.67, m; 2.11, m
3	79.5, CH	3.54, dd (8.8, 3.0)	4	30.4, CH ₂	1.60, m; 1.72, m
4	33.6, CH	1.78, m	5	41.9, CH ₂	3.18, m
4-CH ₃	21.4, CH ₃	0.88, d (6.4)	6	158.5, C	
5	39.0, CH ₂	1.12, m; 1.31, m	NH		8.37, d (9.2)
6	29.0, CH	1.59, m			
6-CH ₃	21.9, CH ₃	1.01, d (6.4)	Leu		
7	46.8, CH ₂	0.92, m; 1.20, m	1	176.5, C	
8	26.5, CH	1.73, m	2	50.9, CH	4.67, dd (9.0, 3.2)
9	24.6, CH ₃	0.93, d (6.5)	3	40.1, CH ₂	1.44, m; 2.20, m
10	14.9, CH ₃	1.11, d (7.1)	4	26.0, CH	1.97, m
Ala			5	23.9, CH ₃	1.05, d (6.6)
1	176.3, C		5'	21.6, CH ₃	1.0, d (6.6)
2	51.3, CH	4.32, q (7.3)	NH		7.58, d (6.1)
3	17.8, CH ₃	1.43, d (7.3)			
Agdha			N-MeGln		
1	176.4, C		1	172.7, C	
2	73.0, CH	3.88, d (8.6)	2	57.9, CH	5.51, bs
3	75.3, CH	3.63, dd (8.6, 1.8)	3	23.9, CH ₂	1.95, m; 2.38, m
4	50.8, CH	4.17, m	4	32.4, CH ₃	2.13, m; 2.23, m
5	26.4, CH ₂	1.63, m	5	177.8, C	
6	26.0, CH ₂	1.64, m	N-CH ₃	31.6, CH ₃	3.04, s
7	42.2, CH ₂	3.22, m			
8	158.6, C				
3,4-diMeGln			ThrOMe		
1	171.3, C		1	171.1, C	
2	59.4, CH	4.19, d (10.4)	2	58.9, CH	4.41, d (9.3)
3	37.6, CH	2.29, ddt (10.4, 9.0, 6.9)	3	76.5, CH	4.16, dq (9.3, 6.3)
3-CH ₃	14.4, CH ₃	1.11, d (6.9)	4	16.4, CH ₃	1.19, d (6.3)
4	42.7, CH	2.8, dt (9.0, 5.6)	O-CH ₃	57.2, CH ₃	3.28, s
4-CH ₃	14.8, CH ₃	1.26, d (5.6)	NH		6.45, d (9.4)
5-CO	180.2		Asp		
aThr			1	171.2, C	
1	174.2, C		2	47.1, CH	5.34, dd (9.6, 4.1)
2	55.9, CH	5.46, d (3.5)	3	36.5, CH ₂	2.48, m; 2.93, m
3	71.4, CH	5.8, dq (6.1, 3.5)	4	174.5, C	
4	14.8, CH ₃	1.26, d (6.1)	NH		8.27, d (9.7)
NH					
Ser			Pip		
1	173.1, C		1	170.8, C	
2	60.6, CH	4.05, t (3.3)	2	53.8, CH ₂	5.25, m
3	62.0, CH ₂	3.98, m; 4.12, m	3	27.4, CH ₂	2.18, m; 1.64, m
			4	22.0, CH ₂	1.27, m; 1.73, m
			5	26.3, CH ₂	1.51, m; 1.64, m
			6	44.8, CH ₂	3.08, m; 3.68, m



Un estudio más en profundidad de los experimentos 2D RMN de COSY, HMBC, HSQC y de 1D TOCSY, permite identificar seis subestructuras parciales que corresponden con los aminoácidos alanina (Ala), treonina (aThr), serina (Ser), arginina (Arg), leucina (Leu), y ácido aspártico (Asp).

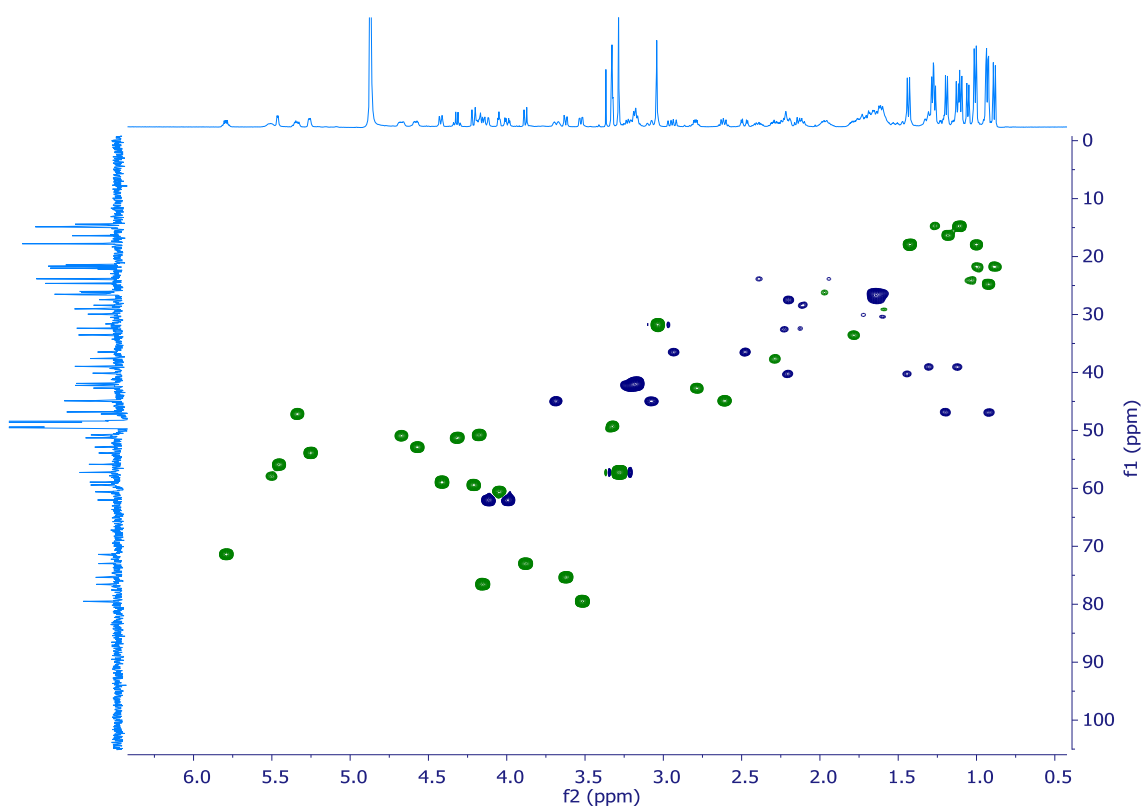


Figura 158. Espectro HSQC (500 MHz, CD₃OD) de daedophamida (8). Señales de color azul corresponden a grupos metileno.

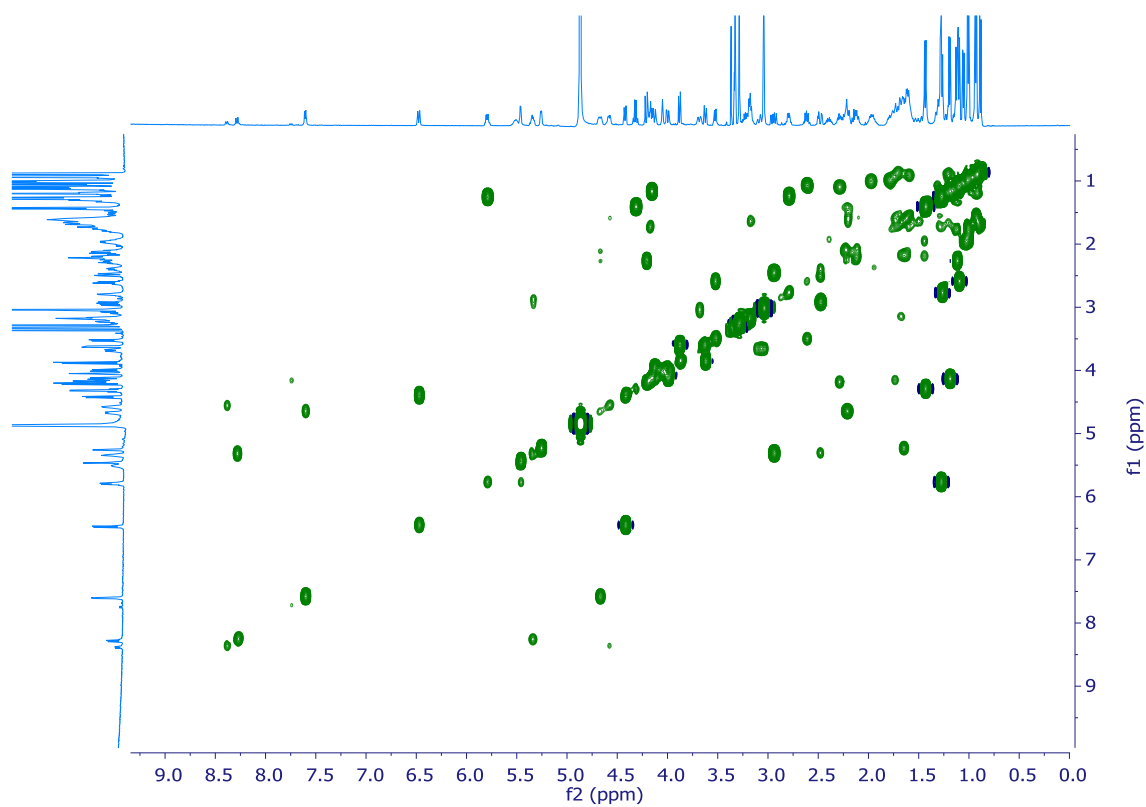


Figura 159. Espectro COSY (500 MHz, CD₃OD) de daedophamida (8).

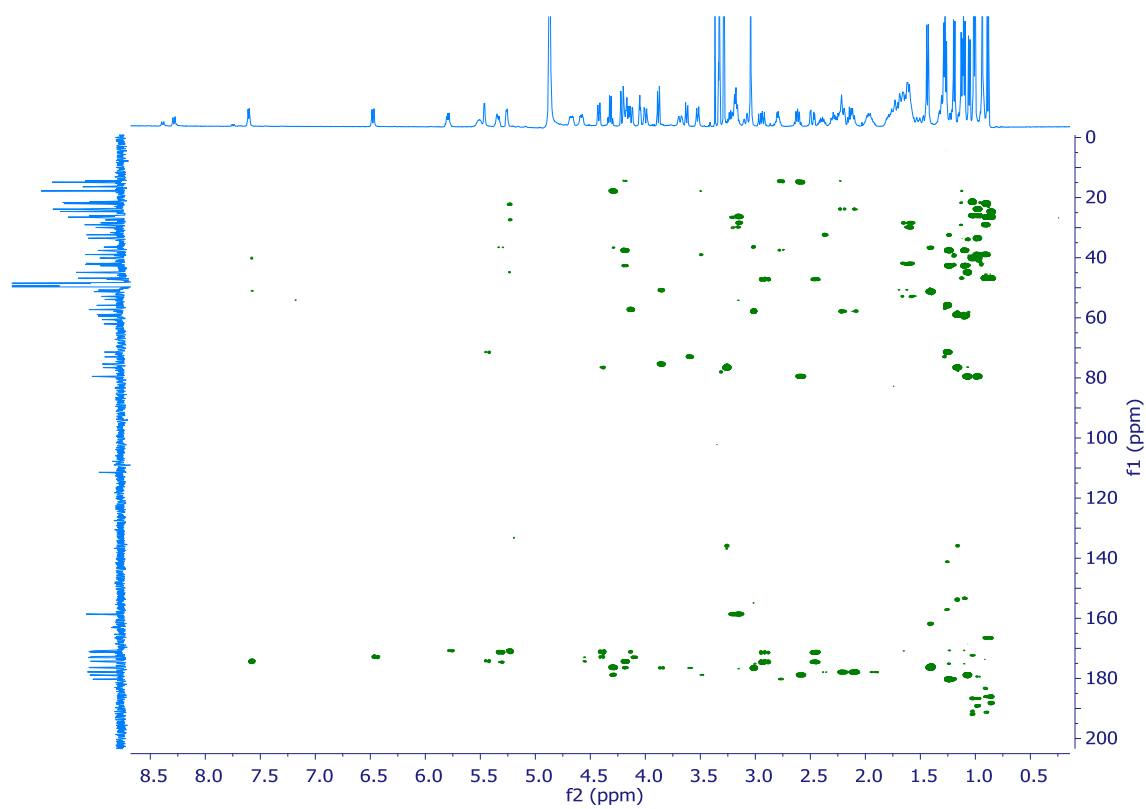


Figura 160. Espectro HMBC (500 MHz, CD₃OD) de daedophamida (8).

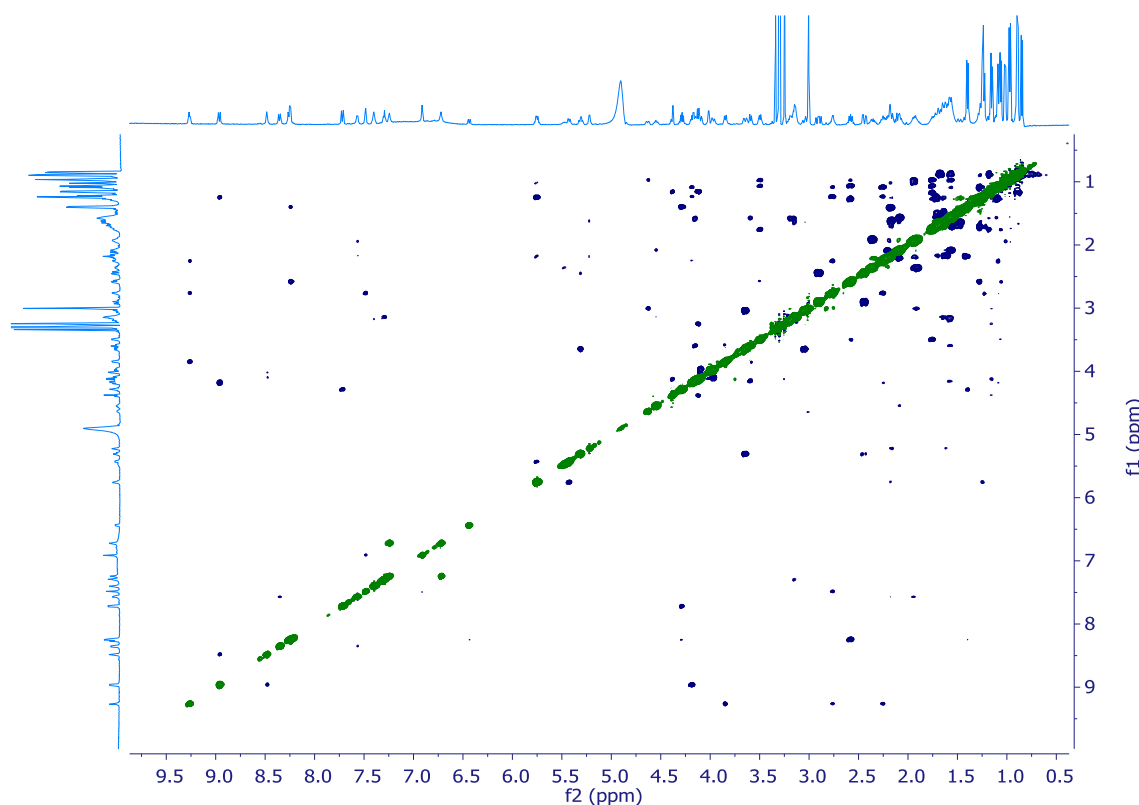


Figura 161. Espectro ROESY (500 MHz, CD₃OD) de daedophamida (8).

Estos aminoácidos se pueden deducir a través del experimento COSY. De esta forma, la presencia de un residuo de arginina se dedujo mediante la correlación COSY entre el protón en la posición α a 4.57 ppm y un metileno (δ_{H} 1.67, 2.11) y entre éste y un segundo metileno (δ_{H} 1.60, 1.72), que a su vez correlaciona con un tercer metileno a 3.18 ppm. El desplazamiento químico de carbono de este tercer metileno a 41.9 ppm indicó que debe estar unido a un nitrógeno. Finalmente, la correlación en el experimento HMBC entre el metileno a 3.18 ppm y un carbono cuaternario a 158.5 ppm, señal característica de un grupo guanidinio que confirmó la existencia de un residuo de arginina en el compuesto.

La presencia del residuo de serina se determinó fácilmente al observarse un sistema de spin entre un protón en posición α a 4.05 ppm y un metileno oxigenado (δ_{C} 62.0; δ_{H} 3.98, 4.12). De la misma forma se dedujo un residuo de treonina mediante una correlación COSY entre el protón en

posición α a 5.46 ppm con un metino oxigenado (δ_C 71.4 ppm; δ_H 5.8, 4.12 ppm), que a su vez correlaciona con un grupo metilo a 1.26 ppm que resuena como doblete.

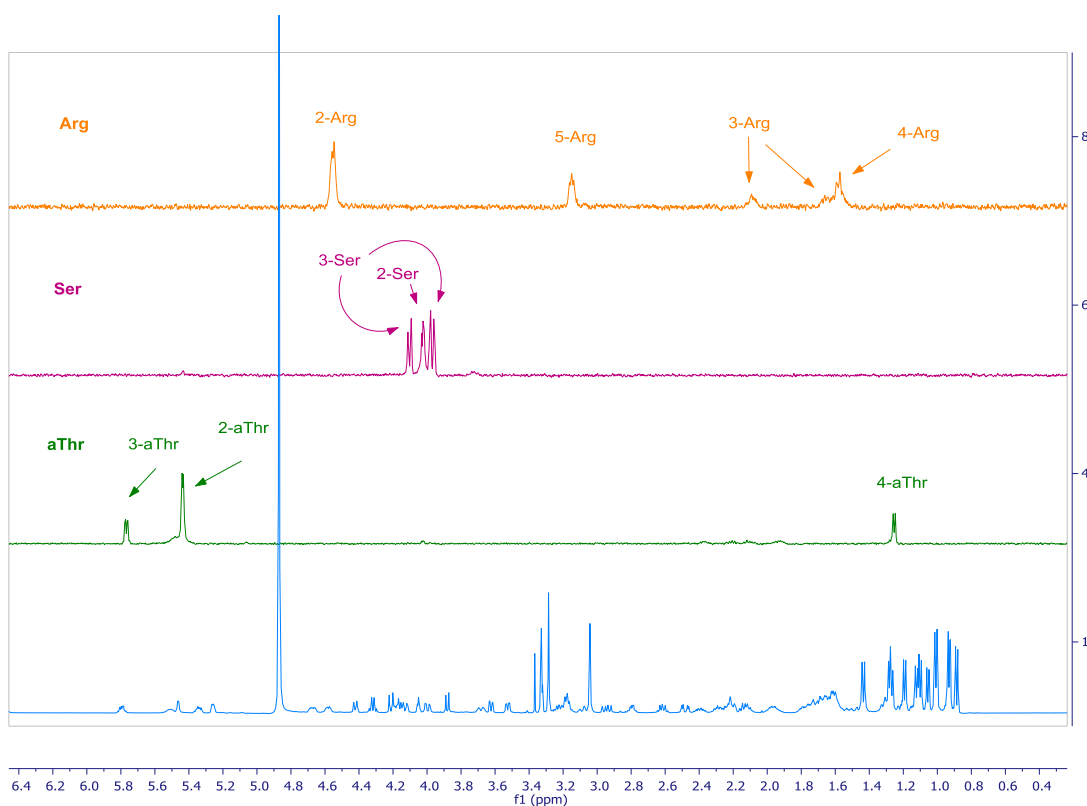


Figura 162. Espectros 1D-TOCSY (500 MHz, CD_3OD) para las señales 5.46, 4.57 y 4.05 ppm en daedophamida (**8**).

En la Figura 163 se muestran los experimentos 1D TOCSY que permitieron deducir la presencia de ácido aspártico, leucina y alanina. El sistema de espín formado por un protón en la posición α a 5.34 ppm y un grupo metileno con un desplazamiento de protón de 2.48 y 2.93 ppm, que a su vez está unido a un grupo carbonilo a 174.5 ppm deducido por una correlación HMBC, confirmando la existencia de un residuo de ácido aspártico.

La presencia de un residuo de leucina en daedophamida (**8**) se dedujo a partir de las correlaciones COSY de la señal a 4.67 ppm, así como del espectro 1D TOCSY. La secuencia de las correlaciones COSY comienza con

la señal del proton en la posición α a 4.67 ppm con un grupo metileno (δ_{H} 1.44, 2.20 ppm), y continúa con la correlación de este último con un metino a 1.97 ppm, que a su vez correlaciona con dos metilos que resuenan como dobletes, a 1.05 y a 1.0 ppm. Finalmente, el aminoácido de alanina se determina de manera idéntica que los residuos anteriores. Se observa correlación COSY entre un protón en posición α a 4.32 ppm con un grupo metilo que resuena como doblete a 1.43 ppm.

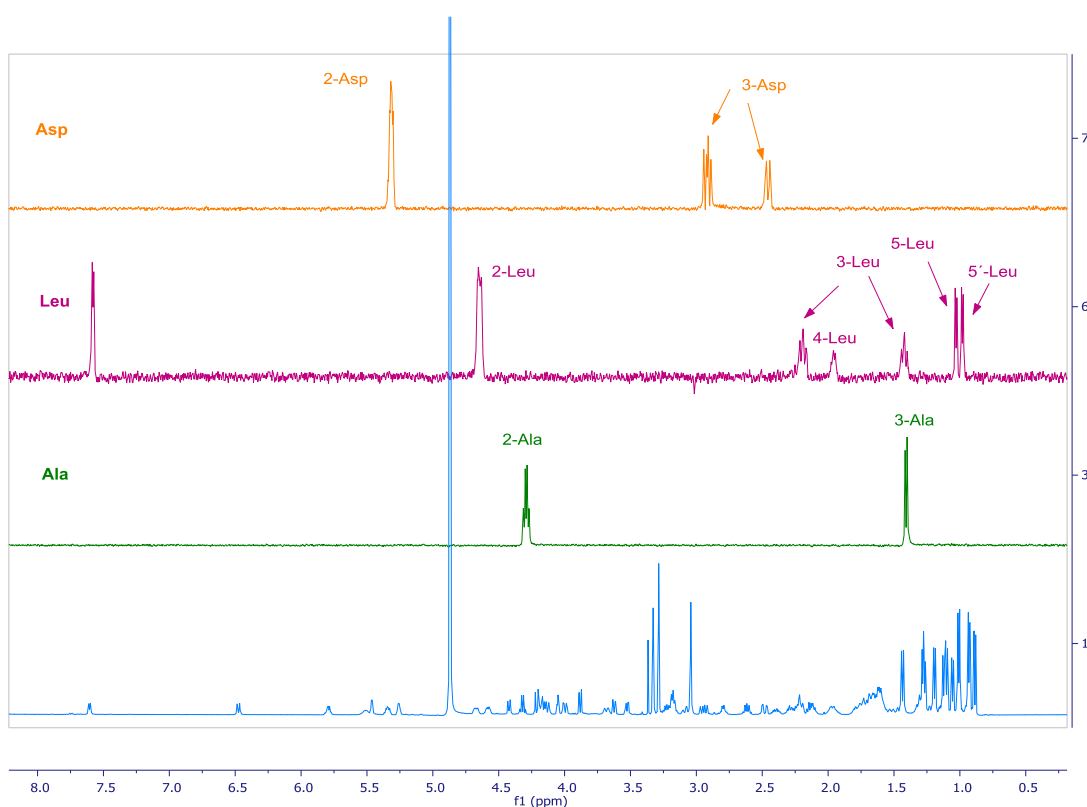


Figura 163. Espectros 1D-TOCSY (500 MHz, CD_3OD) para las señales 5.34, 4.67 y 4.32 ppm en daedophamida (**8**).

Una vez caracterizadas estas seis subestructuras se continuó con el análisis de los de RMN de COSY, HMBC, HSQC-editado y de 1D TOCSY. La señal de un protón en la posición α a 4.41 ppm correlaciona con un metino oxigenado (δ_{C} 76.5 ppm; δ_{H} 4.16 ppm), que a su vez correlaciona con un metilo que resuena como doblete a 1.19 ppm. La correlación a larga distancia observada en el espectro HMBC entre el metino a 76.5 ppm

y un metilo oxigenado que resuena como singlete, indica la presencia de un residuo de *O*-Me-Treonina.

La presencia de un residuo de ácido pipecólico se dedujo a partir del sistema de espín formado por un metino y cuatro metilenos. El protón a 5.25 ppm del metino que corresponde con la posición α , correlaciona con un metileno que resuena a 2.18 y 1.64 ppm, que a su vez se acopla con otro metileno a 1.27 y 1.73 ppm. Continúa el sistema de espín con una correlación COSY con otro metileno a 1.51 y 1.64 ppm, para finalizar con la correlación de este metileno con otro metileno nitrogenado (δ_C 44.8; δ_H 3.08, 3.68 ppm).

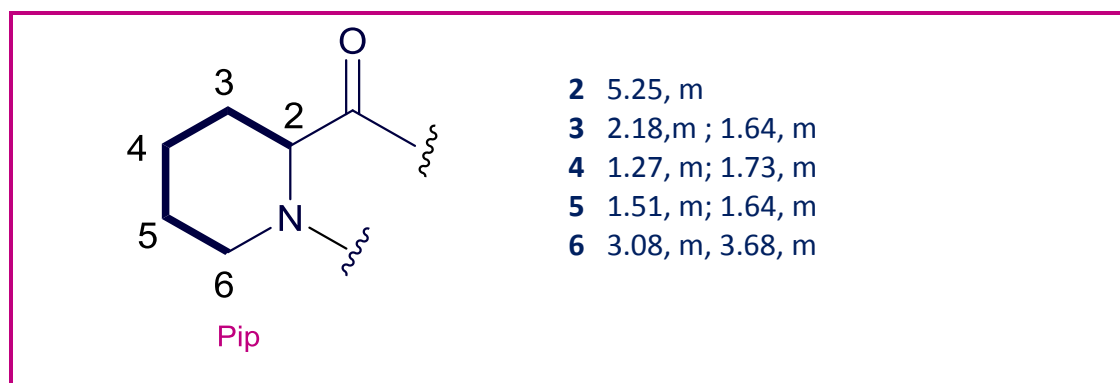


Figura 164. Estructuras y correlaciones COSY del residuo de Pip en daedophamida (8).

Otro de los sistemas de espín se dedujo a partir de otro protón en la posición α de un residuo de aminoácido a 5.51 ppm, que siguiendo las correlaciones completó el sistema de una unidad de glutamina. Así la correlación COSY entre este protón con un metileno a 1.95 y 2.38 ppm, que a su vez correlaciona con otro metileno a 2.13 y 2.23 ppm. Este último metileno presenta una correlación a larga distancia en el experimento HMBC con el grupo carbonilo a 177.8 ppm. Además, se observa una correlación a larga distancia entre el carbono en la posición α a 57.9 ppm y un metilo nitrogenado que resuena como singlete, indicando la

presencia de un aminoácido *N*-metilado. Toda esta información confirma la presencia final de un residuo de *N*-metilglutamina.

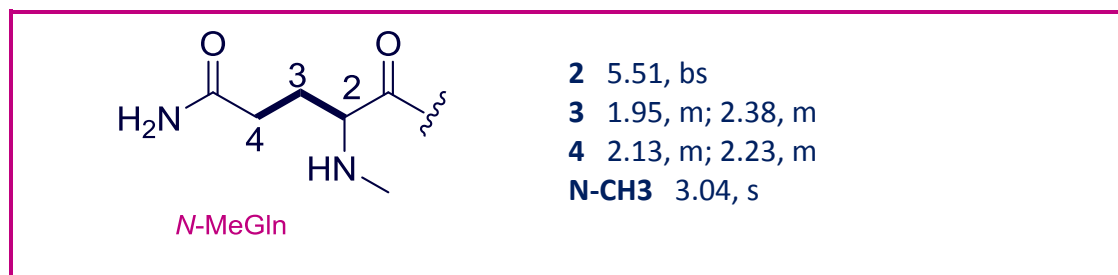


Figura 165. Estructuras y correlaciones COSY del residuo de *N*-MeGln en daedophamida (**8**).

Siguiendo con el estudio del experimento COSY se obtuvo un sistema de espín que comienza con un protón en la posición α a 4.19 ppm que continua con un fragmento $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ a δ_{H} 2.29 (1.11) – 2.80 (1.26). El estudio del espectro HMBC revela una correlación a larga distancia entre el metino a 2.80 ppm y un carbonilo a 180.2 ppm que confirma la presencia de un residuo de 3,4-dimetilglutamina.

Además, los datos de RMN muestran un sistema de espín que comprende un grupo oximetino (δ_{H} 3.54 / δ_{C} 79.5), dos grupos metileno a δ_{H} 1.12 y 1.31 / δ_{C} 39.0 y δ_{H} 0.92 y 1.20 / δ_{C} 46.8), cuatro metinos a δ_{H} 2.61 / δ_{C} 44.8), δ_{H} 1.78 (δ_{C} 33.6), δ_{H} 1.73 (δ_{C} 26.5) y δ_{H} 1.59 (δ_{C} 29.0) y cinco grupos metilo a δ_{H} 1.11, 1.01, 1.01, 0.93 y 0.88 ppm (δ_{C} 14.9, 17.8, 21.9, 24.6 y 21.4 ppm, respectivamente) que se conectaron de C-2 a C-10 por COSY y se confirmaron por las correlaciones a larga distancia observadas de HMBC. La comparación de los datos de RMN para este fragmento en **8** con los de otros similares descritos en la bibliografía (Tabla 21) mostró que coincide con un grupo amino-unido 3-hidroxi-2,4,6,8-tetrametilnonanoico (Htemna) que también está presente como grupo terminal en homophymina D. La correlación HMBC entre el metino a δ_{H} 2.61 y el carbono a δ_{C} 178.9 ppm, corroboró la presencia del grupo carbonilo en C-1 de este residuo.

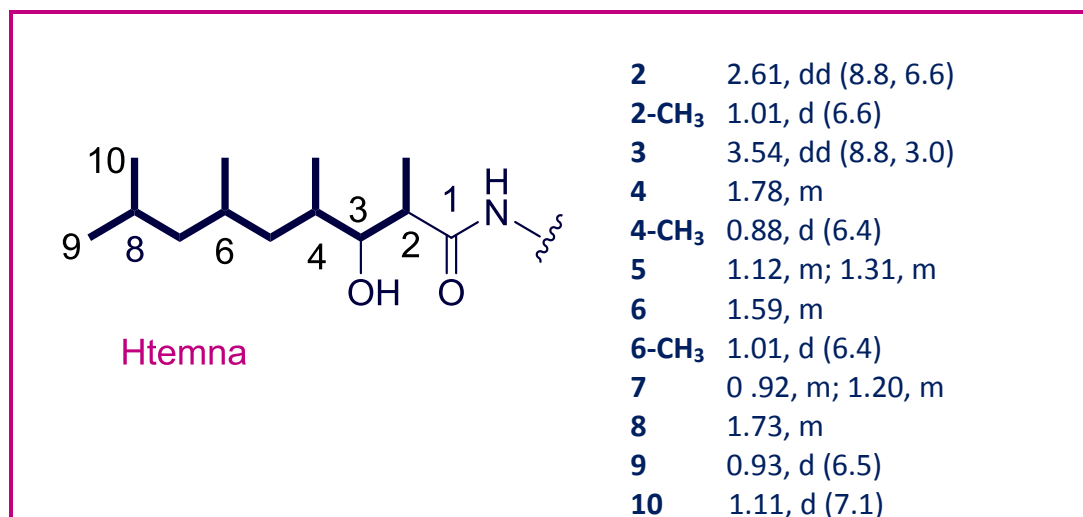


Figura 166. Estructuras y correlaciones COSY del residuo de Htemna daedophamida (8).

Finalmente, la existencia de una cadena larga CH-CH-CH-CH₂-CH₂-CH₂ se estableció mediante las correlaciones COSY y las correlaciones HMBC de H-2 (δ_H 3.88) y H-3 (δ_H 3.63) a un carbonilo a 176.4 ppm permitió la localización de C-1 (δ_C 176.4). Se asignó un carbono de guanidina con su desplazamiento químico típico a 158,6 ppm (C-8). Las resonancias de C-2 (δ_C 73.0) y C-3 (δ_C 75.3) corresponden a carbonos adyacentes a un grupo hidroxilo mientras que se sugiere que el carbono C-4 (δ_C 50.8) se une directamente a un átomo de nitrógeno. Este residuo de espín se asignó como un inusual aminoácido de estructura de ácido 4-amino-7-guanidinio-2,3-dihidroxiheptanoico (Agdha).

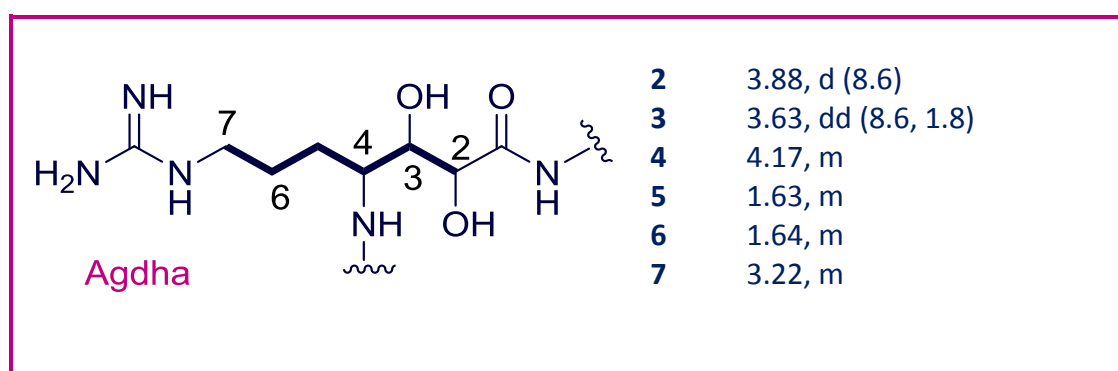


Figura 167. Estructuras y correlaciones COSY del residuo de Agdha daedophamida (8).

6.2.4.2 Determinación de la secuencia de aminoácidos de la daedophamide (8)

Una vez deducida que daedophamida (8) estaba compuesta por 12 residuos, se llevó a cabo la secuenciación mediante el estudio de los espectros HMBC (Figura 160) y ROESY (Figura 161). Las correlaciones a larga distancia entre los protones en la posición α con los grupos carbonilos de los aminoácidos adyacentes, junto con correlaciones ROESY entre los protones α y los protones de grupos amidas de los aminoácidos colindantes que se muestran en la (Figura 168), fueron determinantes en la deducción de dicha secuencia. Dicho estudio dio como resultado la siguiente secuencia: Pip-Asp-ThrOMe-*N*-MeGln-Leu-Arg-Ser- α Thr-3,4-diMeGln-Agdha-Ala-Htemna.

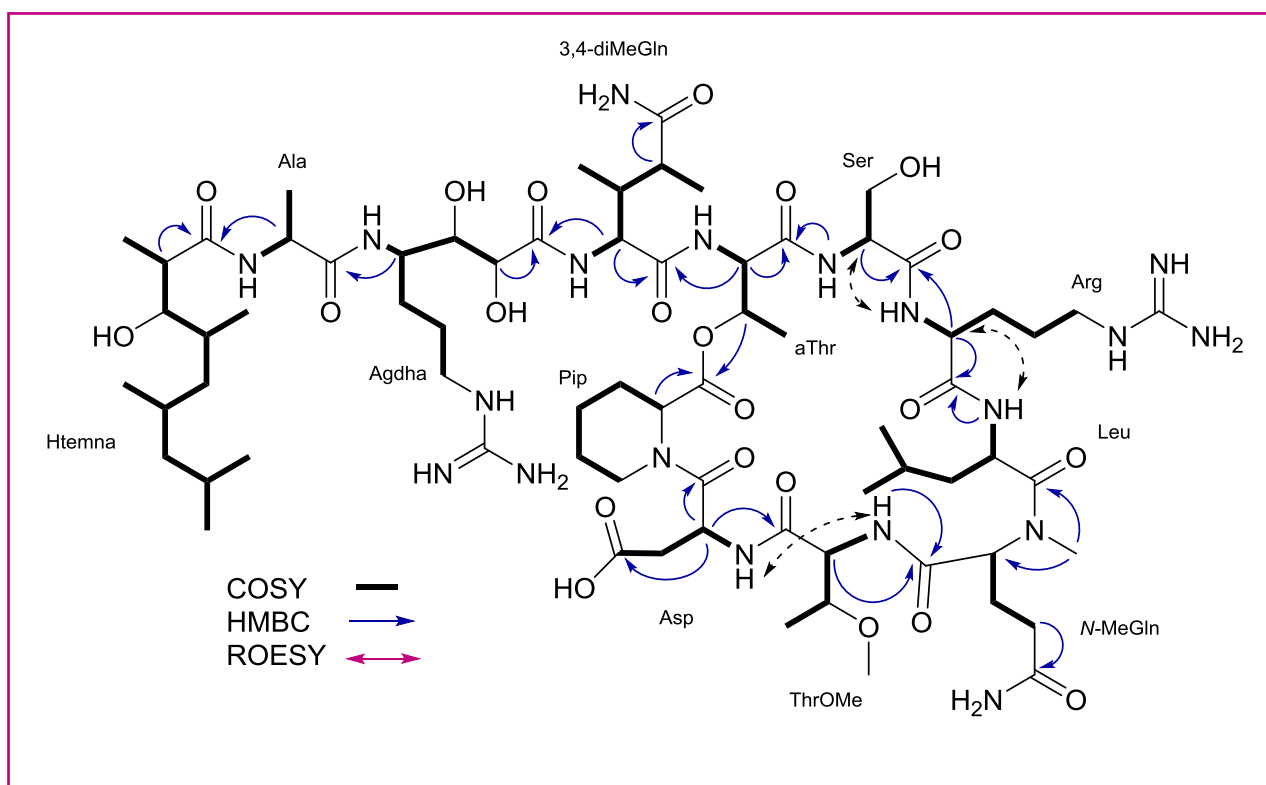


Figura 168. Estructura plana y correlaciones HMBC, ROESY y COSY (500 MHz, CD₃OD) de daedophamide (8).

Entre las correlaciones observadas en el experimento HMBC que fueron determinantes para la secuenciación se encuentran las observadas entre el protón en la posición α a 4.41 ppm del residuo de ThrOMe con el carbonilo a 172.7 ppm del residuo de *N*-MeGln, entre el protón en la posición α a 4.32 ppm del residuo de Ala con el carbonilo a 178.9 ppm del residuo de Htemna y entre el protón en la posición α a 4.41 ppm del residuo de 3,4-diMeGln con el carbonilo a 176.4 ppm del residuo de Agdha, que se muestran en la siguiente figura.

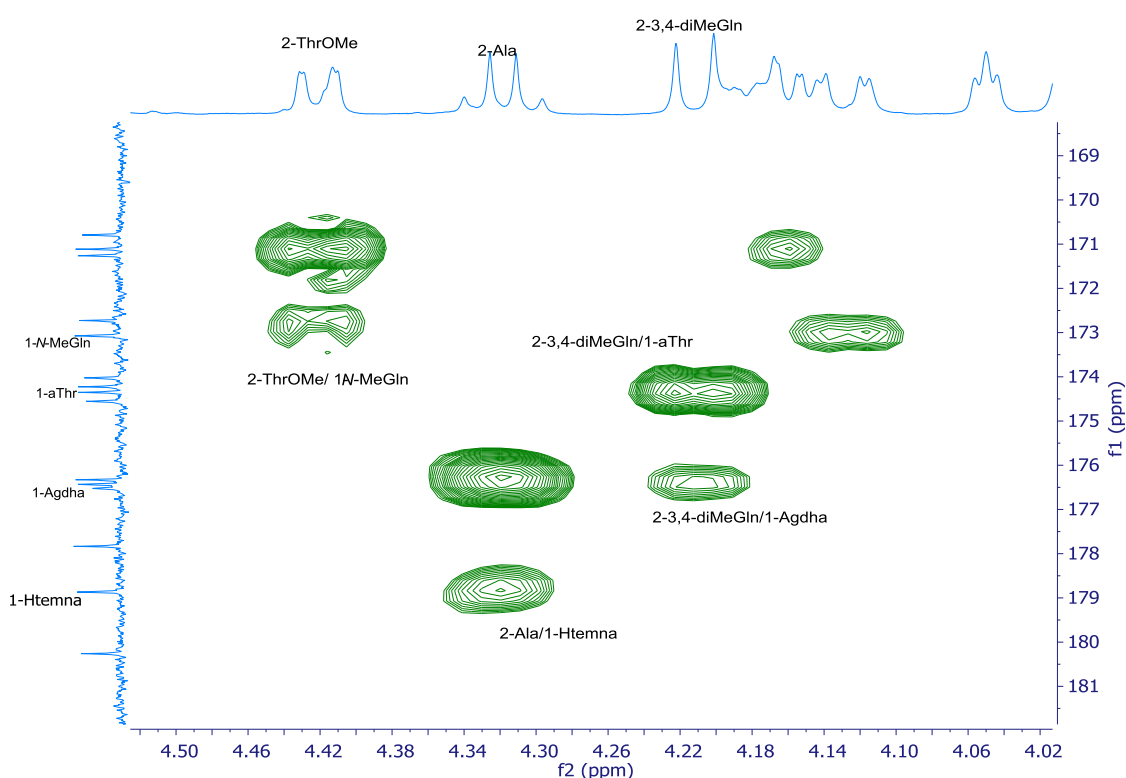


Figura 169. Ampliación del espectro HMBC (500 MHz, CD₃OD) de daedophamida (8).

Además se observaron las correlaciones en el HMBC entre el protón en la posición 3 a 5.80 ppm del residuo de Thr con el carbonilo a 170.8 ppm del residuo de Pip, entre el protón en la posición α a 5.34 ppm del residuo de Asp con el carbonilo a 171.1 ppm del residuo de ThrOMe y el protón en la

posición α a 4.57 ppm del residuo de Arg con el carbonilo a 173.1 ppm del residuo de Ser (Figura 170).

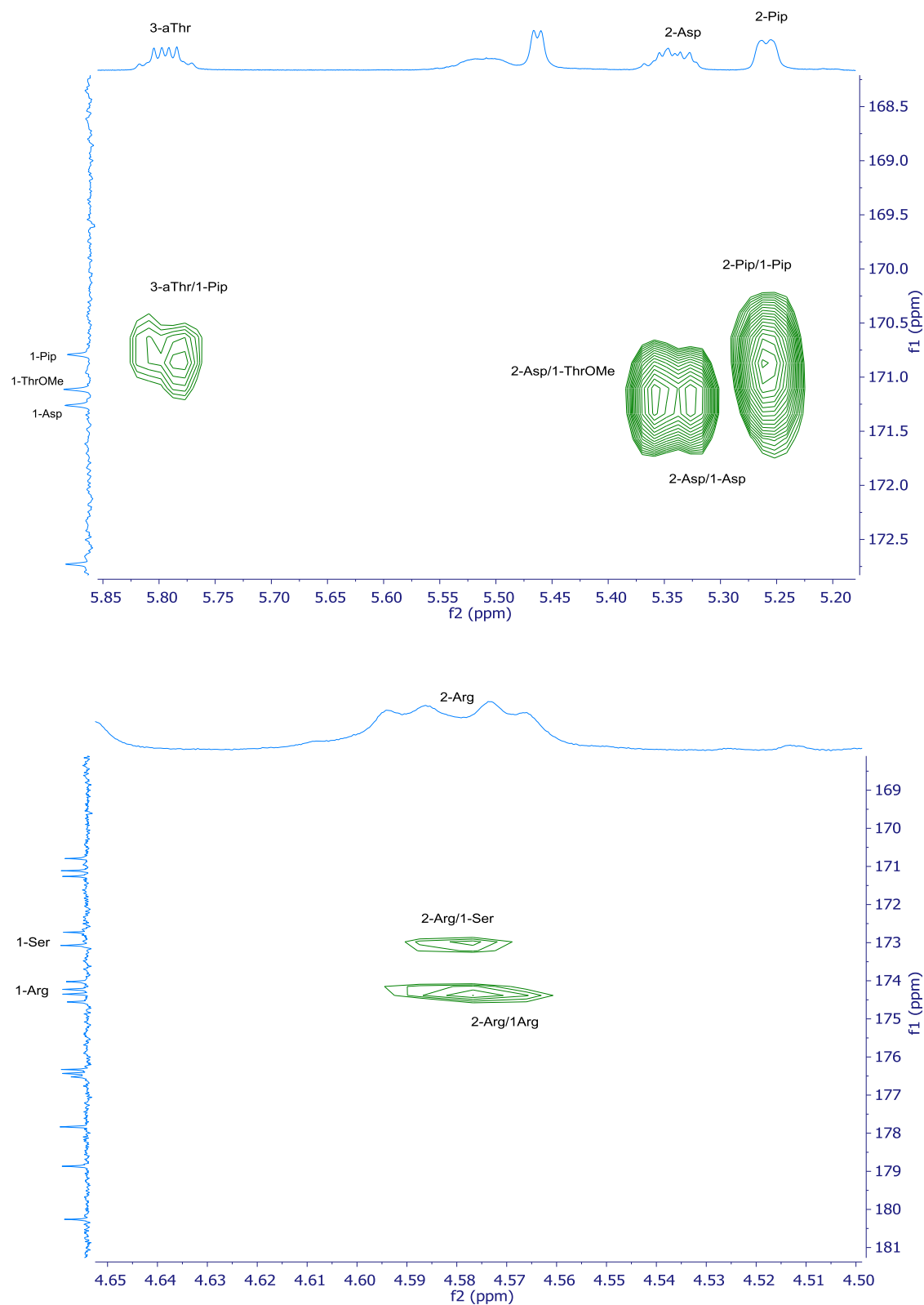


Figura 170. Ampliación del espectro HMBC (500 MHz, CD₃OD) de daedophamida (8).

Finalmente, el análisis de los datos espectrales dio como resultado la siguiente secuencia: Pip-Asp-ThrOMe-N-MeGln-Leu-Arg-Ser-aThr-3,4-diMeGln- Agdha-Ala-Htemna.

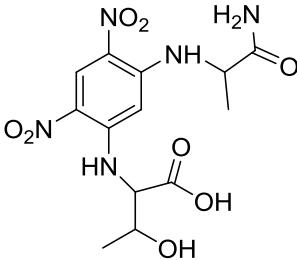
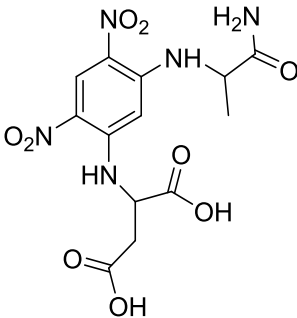
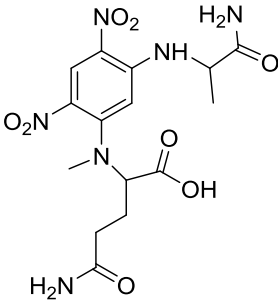
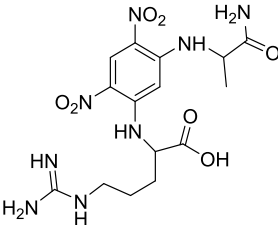
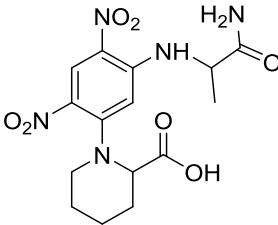
6.2.4.3 Determinación de la estereoquímica absoluta de la daedophamide (**8**)

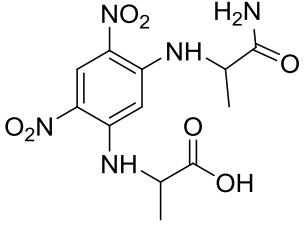
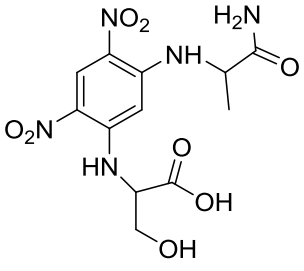
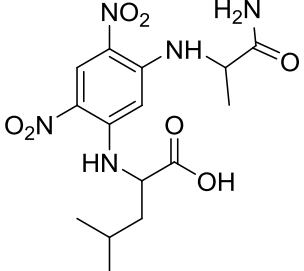
La configuración absoluta correspondiente de Ser, aThr, Leu, Ala, Asp, N-Me-Glu, Arg y Pip correspondiente a ocho de los fragmentos, se estableció mediante la utilización del método de Marfey¹⁰⁷. La de los cuatro residuos restantes no se pudo determinar mediante este método debido a que no se disponía de los correspondientes patrones. Finalmente, mediante la comparación de los desplazamientos químicos de los residuos Agdha, Htemna y 3,4-dimetilglutamina en **8** con la de otros péptidos similares que los contienen, permitió sugerir la estereoquímica relativa. Únicamente quedó por determinar la estereoquímica del residuo de aminoácido Thr-O-Me.

Para el método de Marfey fue necesario realizar una hidrólisis ácida para obtener los aminoácidos libres que se derivatizaron con el reactivo de Marfey (1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-alaninamida). Los aminoácidos derivatizados se separaron y se identificaron mediante HPLC-MS a través de la monitorización selectiva de los iones correspondientes a la unión de aminoácido y el reactivo de Marfey (Tabla 20). Una vez identificados se compararon con los tiempos de retención obtenidos para los patrones de cada aminoácido tanto en su configuración L o D.

¹⁰⁷ Marfey, P. *Calsberg Res. Commun.* **1985**, 49, 591–596.

Tabla 20. Estructura, peso molecular e ion molecular de los aminoácidos de daedophamide (8).

Aminoácido (aa)	Estructura aa + FDAA	Peso molecular aa	Peso molecular aa + FDAA	Ión [M+H] ⁺ HPLC-MS
Treonina		119.1	371.1	372
Ácido aspártico		133.0	385.1	386
N-Me-glutamina		160.1	412.1	413
Arginina		174.1	426.2	427
Ácido piperídico		129.1	381.1	382

Aminoácido (aa)	Estructura aa + FDAA	Peso molecular aa	Peso molecular aa + FDAA	Ión [M+H] ⁺ HPLC-MS
Alanina		89.1	341.3	342
Serina		105.0	357.1	358
Leucina		131.2	383.1	384

Para el residuo de serina, la monitorización selectiva del ion de relación m/z 358 dio un pico cromatográfico con un t_R de 6.9 min, que se identificó como D-serina. La comparación con los patrones de las cuatro posibles configuraciones de la treonina, que presenta un monitoreo selectivo del ion de relación m/z 372, indica que el pico cromatográfico obtenido con un t_R de 8.4 min corresponde con la D-*allo*-treonina.

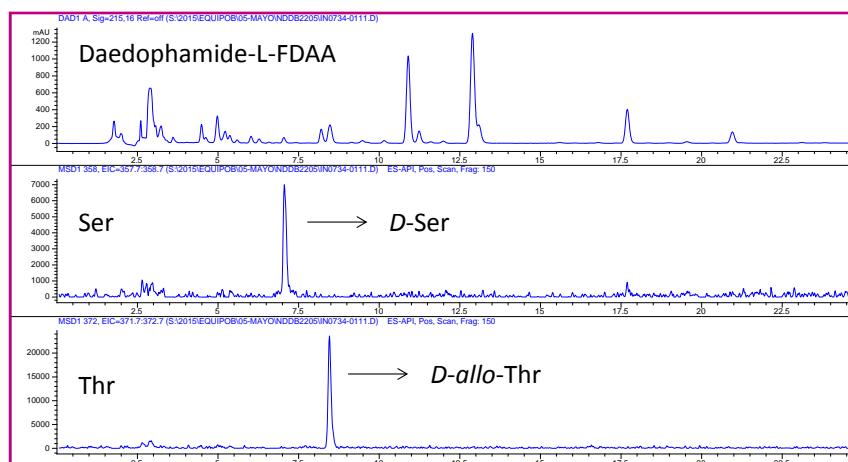


Figura 171 . HPLC-MS y monitorización selectiva del ion de relación m/z derivatizados con L-FDAA de Ser y aThr.

Para el residuo de alanina, el monitoreo selectivo del ion de relación m/z 342 resultó la obtención de un pico cromatográfico con un t_R a 17.8 min que se identificó como D-alanina. Por su parte, el monitoreo selectivo del ion de relación m/z 384 resultó un pico cromatográfico con t_R de 25.8 min que corresponde al aminoácido L-Leucina. Para el residuo de ácido aspártico se obtuvo un t_R de 12.5 min correspondiente al monitoreo selectivo del ion de relación m/z 386, confirmando la presencia de D-ácido aspártico.

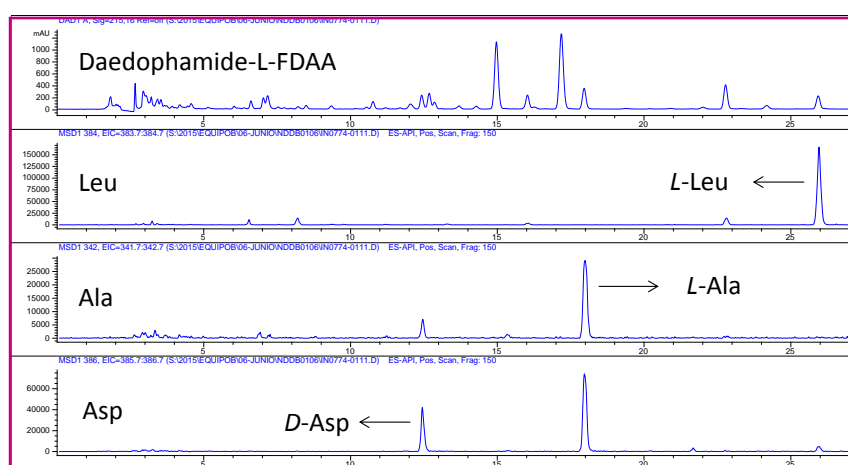


Figura 172. HPLC-MS y monitorización selectiva del ion de relación m/z derivatizados con L-FDAA de Leu, ala y Asp.

Finalmente, los t_R de los monitoreos selectivos de los iones de relación m/z 413 (t_R 38.6), 427 (t_R 6.7) y 382 (t_R 22.9), corresponden con los residuos de aminoácidos *N*-Me-L-glutamina, *D*-arginina y *L*-ácido pipercolico, respectivamente.

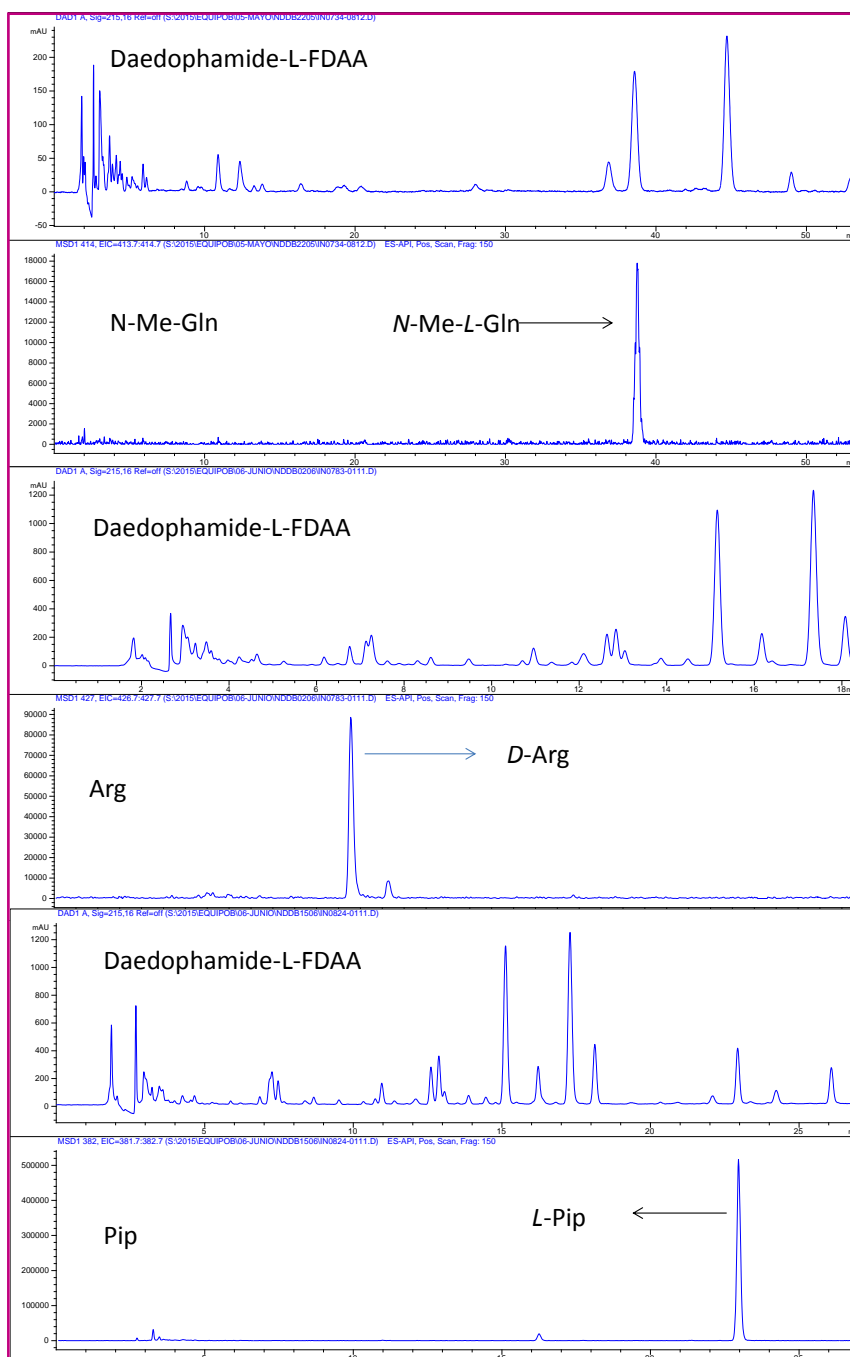


Figura 173. HPLC-MS y monitorización selectiva del ion de relación m/z derivatizados con L-FDAA de *N*-Me-Gln, Arg y Pip.

Se asumió la misma estereoquímica relativa de los residuos de Agdha y Htemna en **8** que en el caso de neamphamida A y homophymina D, respectivamente, por comparación de los desplazamientos químicos en RMN ^1H y ^{13}C como puede observarse en la Tabla 21.

Tabla 21. Comparación de los datos de RMN en CD_3OD de los residuos de Agdha y Htemna en **8** y en los presentes en neamphamida A¹⁰⁸ y homophymina D¹⁰⁹, respectivamente.

Agdha					Htemna				
posición	Daedophamida (8)		Neamphamida A		posición	Daedophamida (8)		Homophymina D	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}		δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	73.0	3.88	72.9	3.88	1	178.9		178.7	
3	75.3	3.63	75.3	3.61	2	44.8	2.61	44.7	2.66
4	50.8	4.17	50.9	4.16	2-CH ₃	17.8	1.01	17.6	1.01
5	26.4	1.63	26.5	1.74	3	79.5	3.54	79.1	3.59
6	26.0	1.64	26.3	1.60, 1.70	4	33.6	1.78	33.5	1.79
7	42.2	3.22	41.9	3.17	4-CH ₃	21.4	0.88	21.5	0.91
8	158.6		158.6		5	39.0	1.12, 1.31	38.0	1.18, 1.26
					6	29.0	1.59	28.6	1.60
					6-CH ₃	21.9	0.93	21.8	0.87
					7	46.8	0.92, 1.20	46.4	0.94, 1.23
					8	26.5	1.73	26.4	1.70
					9	24.6	0.93	24.4	0.91
					10	14.9	1.11	14.5	1.06

¹⁰⁸ Oku, N.; Gustafson, K. R.; Cartner, L. K.; Wilson, J. A.; Shigematsu, N.; Hess, S.; Pannell, L. K.; Boyd, M. R.; McMahon, J. B. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 1407–1411.

¹⁰⁹ Zampella, A.; Sepe, V.; Bellota, F.; Luciano, P.; D'Auria, M. V.; Cresteil, T.; Debitus, C.; Petek, S.; Poupat, C.; Ahond, A. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 4037–4044.

Finalmente, la estereoquímica del residuo de 3,4-dimetilglutamina se asumió como la misma que se encuentra en péptidos similares como son callipeltin A, N y P,¹¹⁰ homophyminas B-E, neamphamida A y pipecolidepsinas A-B¹¹¹.

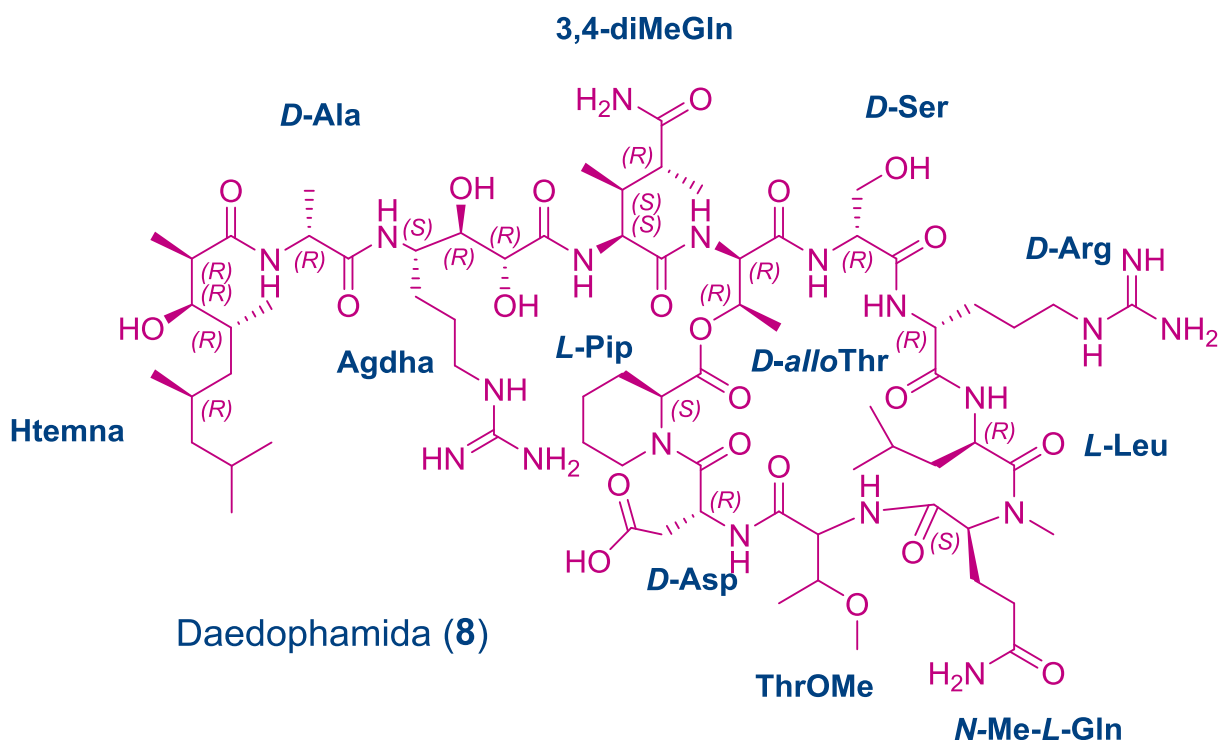


Figura 174. Estructura y configuración absoluta de absoluta de daedophamida (8).

6.2.5 Actividad citotóxica de daedophamide (8)

Daedophamide presenta una actividad citotóxica moderada frente células tumorales de mama (MDA-MB-231), colon (HT-29), pulmón (A-549) y pancreas (PSN-1) con valores del orden micromolar.

¹¹⁰ a) Zampella, A.; Auria, M. V. D.; Paloma, L. G.; Casapullo, A.; Minale, L.; Henin, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6202–6209. b) Stierhof, M.; Østnes, K.; Sharma, M.; Feussner, K.; Isaksson, J.; Subko, K.; Fern, F.; Ignacio, P.; Tabudravu, J. N. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 6929–6934.

¹¹¹ Coello, L.; Reyes, F.; Martín, M. J.; Cuevas, C.; Fernández, R. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 298–303.

Tabla 22. Datos de la actividad citotóxica (μM) de la daedophamide (**8**) y doxorubicin.

		Línea células tumorales			
		Mama	Colon	Pulmón	Páncreas
		MDA-MB-231	HT-29	NSLC A-549	PSN-1
Daedophamide (8)	GI ₅₀	0.3	0.6	0.4	0.2
	TGI	0.6	0.8	0.5	0.3
	LC ₅₀	0.9	1.3	0.7	0.6
	GI50	0.15	0.27	0.21	0.2
Doxorubicin	TGI	0.50	0.86	0.85	0.5
	LC50	2.41	>17.2	>17.2	3.1

6.3 Conclusiones

Se ha aislado un nuevo ciclodepsipéptido a partir del extracto orgánico de la esponja *Daedalopelta* sp. Su estructura se estableció mediante métodos espectroscópicos, el método de Marfey y por comparación de sus desplazamientos químicos de RMN con los de los ciclodepsipeptidos neamphamida A y homophymina D. Daedophamide mostró una fuerte actividad biológica frente a cuatro líneas celulares tumorales humanas. El compuesto **8** comparte algunos residuos con los ciclodepsipéptidos aislados anteriormente, tales como los residuos 3,4-dimetilglutamina, leucina y *N*-metilglutamina presentes en homophymina D, neamphamida A y callipeltina A. Los residuos Agdha, arginina y treonina también se encuentran en neamphamida A y callipeltina A. mientras que el ácido pipercolico se encuentra en la homophymina D y la neamphamida A. Finalmente, Htmna, serina, ácido aspártico y metoxitreonina está presente en la homophymina D y el residuo de alanina en la callipelin A.



Capítulo 7: Parte experimental

CAPÍTULO 7: PARTE EXPERIMENTAL

7.1 Procedimientos generales

Espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN): Los espectros de resonancia magnética nuclear se obtuvieron con el equipo Varian “Unity 500” a 500/125 MHz ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) de Pharmamar. Se utilizaron como disolventes deuterados metanol, cloroformo, piridina, benceno, acetonitrilo y diclorometano. Los desplazamientos químicos fueron determinados en la escala δ en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento en Hz. Para los espectros de protón ^1H RMN se utilizó como referencia interna la señal del disolvente no deuterado a δ_{H} 3.30 para el CD_3OD , a δ_{H} 7.26 para el CDCl_3 , a δ_{H} 8.74, 7.58 y 7.22 para $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, a δ_{H} 0.40 and 7.60 para C_6D_6 , a δ_{H} 1.96 para CD_3CN y a δ_{H} 5.32 para CD_2Cl_2 . Los espectros de carbono ^{13}C RMN se referenciaron frente al pico central del disolvente a δ_{C} 49.0 para el CD_3OD , a δ_{C} 77.0 para el CDCl_3 , a δ_{C} 150.35, 135.91 y 123.87 para $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, a δ_{C} 128.1 para C_6D_6 , a δ_{H} 118.3 y 54.0 para CD_3CN y a δ_{C} 5.32 para CD_2Cl_2 .

Espectros de masas: Los espectros de masas se realizaron mediante técnica de ionización electrospray ((+)-ESIMS) utilizando un espectrómetro Agilent 1100 Series LC/MSD. Los espectros de masas de alta resolución se llevaron a cabo mediante ionización MALDI (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz) en un espectrómetro Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer utilizando como matriz ácida α -ciano-4-hidroxicinámico y mediante técnica de ionización por electrospray utilizando un espectrómetro Agilent 6230 TOF LC/MS.

Espectro de IR: Se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR con muestreo ATR (Attenuated Total Reflection) y los valores están dados en cm^{-1} .

Actividades ópticas: Se midieron en un polarímetro Jasco P-1020.

Técnicas cromatográficas:

Cromatografía flash a vacío (VFC): Se realizó en una placa filtrante rellena de sílice en fase inversa Lichoprep RP-18 (Merck KGaA). Las muestras se introdujeron mediante cabeza de columna. Los disolventes utilizados fueron agua (H_2O), metanol (CH_3OH), diclorometano (CH_2Cl_2) o mezclas de los mismos.

Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC): Se utilizó un sistema Agilent 1100 Series provisto de un detector UV. Se emplearon columnas en fase reversa semipreparativas Waters Symmetry C_{18} 7.8 x 150 mm y Waters X-Bridge C_{18} 10 x 150 mm. Todos los disolventes empleados fueron grado HPLC.

7.2 Parte experimental Capítulo 2

Recolección de la muestra: La esponja *Cribrochalina* sp. se recolectó a mano mediante buceo en la isla de Pemba, al norte de Tanzania (05° 24.200' S/ 39° 47.730' E) a una profundidad entre 6 y 40 metros en febrero de 2006 y se congeló inmediatamente después de su recolección. Un trozo de la muestra (ORMA40772) está depositada en PharmaMar. La identificación taxonómica de esta esponja fue realizada por la Dra. María Jesús Uriz del Centro de Estudios Avanzados de Blanes (CEAB).

Extracción y fraccionamiento: Una muestra de *Cribrochalina* sp. (125 g) se trituró y se extrajo tres veces con una mezcla CH₃OH:CH₂Cl₂ (50:50, 3 × 500 mL). Se obtuvo 2.90 g del extracto orgánico que se fraccionó mediante VFC con un gradiente desde H₂O a CH₃OH y finalizando con CH₂Cl₂.

Fracción	RP1	RP2	RP3	RP4	RP5	RP6
Disolvente	H ₂ O	H ₂ O:CH ₃ OH (3:1)	H ₂ O:CH ₃ OH (1:1)	H ₂ O:CH ₃ OH (1:3)	CH ₃ OH	CH ₂ Cl ₂
Volumen (mL)	200	200	200	200	200	200
Cantidad (mg)	880	555	95	105	170	119

La fracción eluída con CH₃OH (RP5: 170 mg) se separó mediante HPLC semipreparativo en una columna Waters Symmetry C₁₈ (7 μm, 7.8 × 150 mm), con un gradiente desde 5% a 40% de CH₃CN en H₂O con 0.1% TFA en 5 min para continuar desde 40% a 80% en 30 min. El flujo empleado fue de 2.8 mL/min y se obtuvo el compuesto **1** (6.1 mg) en la fracción H3 que se eluyó con un tiempo de retención de 11.2 min.

Fracción	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10
Cantidad (mg)	2.3	1.2	6.1	5.2	3.8	4.8	0.8	1.2	0.8	10

Análisis de la configuración de los aminoácidos mediante el empleo del método avanzado de Marfey: El compuesto **1** (0.3 mg) se hidrolizó con 0.5 mL de 6N HCl. La mezcla se calentó 110 °C durante 18 h y se llevó a sequedad el exceso acuoso de HCl mediante corriente de N₂. El hidrolizado seco se dividió en dos porciones. A la primera de ellas se añadió 100 μL de H₂O y 0.4 mg of 1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-L-alaninamida (L-FDAA, reactivo de Marfey) disuelto en 100 μL acetona y 40 μL de NaHCO₃ (1 M). La mezcla se calentó a 40 °C durante una hora. A la segunda porción se

añadió una mezcla racémica de 0.2 mg de 1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-L-alaninamida (L-FDAA) en 50 μL acetona, 0.2 mg of 1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-D-alaninamida (D-FDAA) en 50 μL de acetona y 40 μL de NaHCO_3 (1 M) y la mezcla se calentó a 40 °C durante una hora. Ambas reacciones se finalizaron con la adición de 100 μL de HCl (2 N). La mezcla resultante se secó y se disolvió con 660 μL de H_2O . Las alícuotas se analizaron en HPLC/MS en fase reversa empleando una columna Waters Symmetry (C_{18} , 150 \times 4.6 mm, 5 μm) y usándose como fase móvil un gradiente desde 30% a 70% de CH_3CN en H_2O con 0.04% TFA en 30 min con un flujo de 0.8 mL/min.

Residuo	Alanina	Valina	N-MeValina	Isoleucina	N-MeIsoleucina
t_R (min) primera porción	6.4	11.7	14.4	14.7	17.3
t_R (min) segunda porción	6.4, 9.5	11.9, 15.5	14.4, 16.5	14.8, 18.8	17.7, 19.9

Racemización de N-metil-L-isoleucina comercial: 0.4 mg de N-Me-L-Ile comercial (Fluka 02675) se disolvió en 100 μL de H_2O . Se añadió 40 μL de trietilamina y 40 μL de anhídrido acético. La mezcla se calentó a 60 °C durante una hora y se llevó a sequedad bajo corriente de N_2 . Como resultado se obtuvo una mezcla de N-Me-L-Ile and N-Me-D-*allo*-Ile

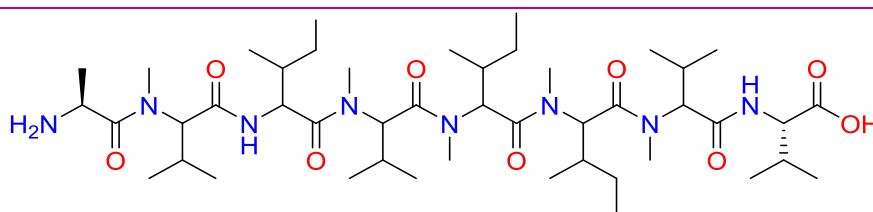
Análisis de la racemización de N-metil-L-isoleucina comercial mediante el empleo del método avanzado de Marfey: La mezcla racémica obtenida en el apartado anterior se hizo reaccionar de la misma forma que se describió previamente para el análisis del resto de los aminoácidos., obteniéndose 4 estereoisómeros: L-FDAA-N-Me-L-Ile, L-FDAA-N-Me-D-*allo*-Ile, D-FDAA-N-Me-L-Ile (que equivale a L-FDAA-N-Me-D-Ile) y D-FDAA-N-Me-D-*allo*-Ile, (que equivale to L-FDAA-N-Me-L-*allo*-Ile). Los cuatro estereoisómeros

fueron analizados por HPLC/MS empleando una columna Waters Xbridge, 250 × 4.6 mm, 5 µm, empleando como fase móvil un gradiente desde 25% a 65% de CH₃CN en H₂O con 0.04% TFA durante 50 min y un flujo de 1 mL/min.

Residuo	L-FDAA- <i>N</i> -Me-L-Ile	L-FDAA- <i>N</i> -Me-D-allo-Ile	D-FDAA- <i>N</i> -Me-L-Ile	D-FDAA- <i>N</i> -Me-D-allo-Ile
<i>t_R</i> (min)	26.6	29.8	30.1	26.9

Análisis de la configuración de la isoleucine comercial mediante el empleo del método avanzado de Marfey: 0.3 mg de una mezcla de L-Ile y D-allo-Ile comercial (Sigma I2877) se hizo reaccionar con una mezcla 1:1 de L-FDAA y D-FDAA de la misma manera como la descrita para el caso de *N*-Me-Ile. Se obtuvieron 4 estereoisómeros que fueron analizados por HPLC/MS usando una columna Phenomenex, Lux Cellulose-4 (250 × 4.6 mm, 5 µm, 100 Å), y como fase móvil un gradiente isocrático de 35% de CH₃CN en H₂O con 0.1% TFA durante 50 min y un flujo de 1 mL/min.

Residuo	L-Ile	L-allo-Ile	D-Ile	D-allo-Ile
<i>t_R</i> (min)	29.8	25.4	38.4	31.4



Pembamida (1)

Pembamida (1):

Sólido incoloro

$[\alpha]_D^{25} -169.9$ (c 0.06, MeOH)

UV (MeOH)= λ_{\max} 200 nm

IR (ATR) ν_{\max} = 3329, 2964, 1630, 1468, 1401, 1290, 1204, 1135, 1096 cm^{-1}
 (+)-HRES-TOFMS m/z 895.6596 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{46}\text{H}_{86}\text{N}_8\text{O}_9$, 895.6596)

Experimento	Figura N.º	Tabla N.º	Página N.º
RMN ^1H	20		37
RMN ^{13}C	21		37
Datos RMN		2	38
RMN COSY	22		39
RMN HSQC	23		39
RMN HMBC	24, 27		40, 43
RMN TOCSY	25, 26, 28, 29		41, 42, 45, 46
RMN ROESY	30		47

7.3 Parte experimental Capítulo 3

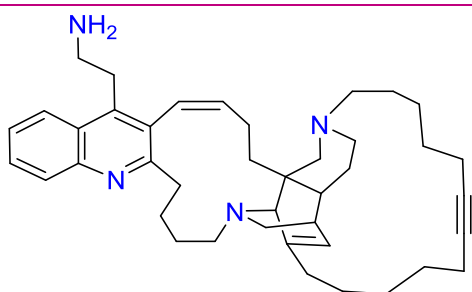
Recolección de la muestra: La esponja *Reniera* sp. se recolectó a mano mediante buceo en la isla de Okuza, al sur de Tanzania (08° 55. 552' S / 039° 34.863' E) a una profundidad entre 5 y 45 metros en octubre de 2007 y se congeló inmediatamente después de su recolección. Un trozo de la muestra (ORMA50962) está depositada en PharmaMar. La identificación taxonómica de esta esponja fue realizada por Dr. Jose Luis Carballo.

Extracción y fraccionamiento: Una muestra de *Reniera* sp. (57 g) se trituró y se extrajo tres veces con una mezcla $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (50:50, 3 × 500 mL). Se obtuvo 1.1 g del extracto orgánico que se fraccionó mediante VFC con un gradiente desde H_2O a CH_3OH y finalizando con CH_2Cl_2 .

Fracción	RP1	RP2	RP3	RP4	RP5	RP6
Disolvente	H ₂ O	H ₂ O:CH ₃ OH (3:1)	H ₂ O:CH ₃ OH (1:1)	H ₂ O:CH ₃ OH (1:3)	CH ₃ OH	CH ₂ Cl ₂
Volumen (mL)	200	200	200	200	200	200
Cantidad (mg)	390	212	39	30	90	108

La fracción eluída con CH₃OH (RP5: 90 mg) se separó mediante HPLC semipreparativo en una columna Waters Symmetry C₁₈ (7 μm, 7.8 × 150 mm), con un gradiente desde 15% a 30% de CH₃CN en H₂O con 0.1% TFA en 30 min y con un flujo de 2.3 mL/min. De la fracción H4 eluída con un tiempo de retención de 11.7 min se obtuvo el compuesto **1** (40 mg).

Fracción	H1	H2	H3	H4
Cantidad (mg)	33	4.0	12	40



Njaoamina I (**2**)

Njaoamina I (**2**):

Sólido incoloro

$[\alpha]_D^{25}$ -14.0 (c 1.5, MeOH)

UV (MeOH)= λ_{\max} 208, 236 nm

IR (ATR) ν_{\max} = 2935, 1677, 1439, 1203, 1135, 841, 800, 760, 723, 701 cm⁻¹

(+)-HRES-TOFMS m/z 605.4585 $[M + H]^+$ (calcd. for C₄₁H₅₇N₄, 605.4578)

Experimento	Figura N.º	Tabla N.º	Página N.º
RMN ^1H	50		74
RMN ^{13}C	49		74
Datos RMN		6	76
RMN COSY	52		75
RMN HSQC	51		75
RMN HMBC	53		77
RMN HSQC-TOCSY	56		80

7.4 Parte experimental Capítulo 4

Recolección de la muestra: El coral blando *Protodendron repens* se recolectó a mano mediante buceo en la isla de Okuza, al sur de Tanzania ($08^\circ 34.795' \text{ S} / 039^\circ 30.393' \text{ E}$) a una profundidad entre 15 y 21 metros en octubre de 2007 y se congeló inmediatamente después de su recolección. Un trozo de la muestra (ORMA51093) está depositada en PharmaMar. La identificación taxonómica de este coral fue realizada por la Dra. Susana Soto (CEAB-Centro de Estudios Avanzados de Blanes, España).

Extracción y fraccionamiento: Una muestra de *Protodendron repens* (25 g) se trituró y se extrajo tres veces con una mezcla $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (50:50, $3 \times 500 \text{ mL}$). Se obtuvo 1.5 g del extracto orgánico que se fraccionó mediante VFC con un gradiente desde H_2O a CH_3OH y finalizando con CH_2Cl_2 .

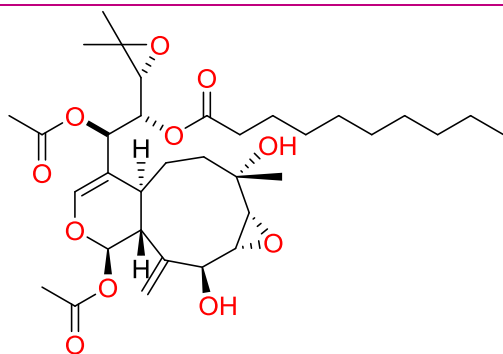
Fracción	RP1	RP2	RP3	RP4	RP5	RP6
Disolvente	H_2O	$\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}$ (3:1)	$\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1)	$\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:3)	CH_3OH	CH_2Cl_2
Volumen (mL)	200	200	200	200	200	200
Cantidad (mg)	637	104	11	18	289	163

La fracción eluída con CH₃OH (RP5: 289 mg) se separó mediante HPLC semipreparativo en una columna Waters Symmetry C₁₈, (7 μm, 7.8 × 150 mm), con un gradiente desde 80% a 90% de CH₃CN en H₂O con 0.1% TFA en 20 min y con un flujo de 2.8 mL/min. De las fracciones H8 y H12 eluidas con unos tiempos de retención de 8.8 y 13.5 min, se obtuvieron los compuestos **3** (10 mg) y **4** (2 mg), respectivamente.

Fracción	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7
Cantidad (mg)	10	1.3	3.1	1.9	2.0	3.0	5.4
Fracción	H8	H9	H10	H11	H12	H13	
Cantidad (mg)	10	5.2	3.9	2.7	2	16	

Preparación de los esteres (*R*)- y (*S*)-MTPA de protoxenicin A: Una solución de **3** (1.5 mg en 0.5 mL de piridina) y 5 μL de cloruro de *S*-(+)- o *R*-(-)-MTPA se añadió a un tubo de RMN y se dejó reaccionar durante 7 horas a temperatura ambiente. Los esteres obtenidos se analizaron mediante RMN de ¹H y se midieron los valores Δδ (δ_S - δ_R) para H-1, H-8, H-18 y H-19.

Preparación del acetónido de protoxenicin B: 1.5 mg del compuesto **4** se disolvió en 50 μL de acetona anhidra y se adicionó con 2,2-dimetoxipropano (200 μL) y 0.4 mg de ácido camforsulfónico a temperatura ambiente. La mezcla se agitó hasta la desaparición del producto de partida transcurridas tres horas. Se añadió 0.75 μL de trietilamina y se secó bajo corriente de hidrógeno para obtener 1 mg de compuesto puro.



Protoxenicina A (3)

Protoxenicina A (3):

Sólido incoloro

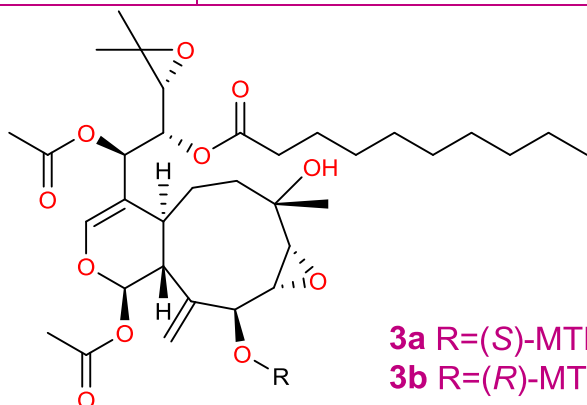
$[\alpha]_D^{25}$ 41.9 (c 0.85, MeOH)

UV (MeOH)= λ_{\max} 220 nm

IR (ATR) ν_{\max} = 3491, 2958, 2928, 2856, 1742, 1666, 1457, 1371, 1229, 1167, 1104, 1038, 1017, 966, 936, 916, 869, 811, 743 cm^{-1}

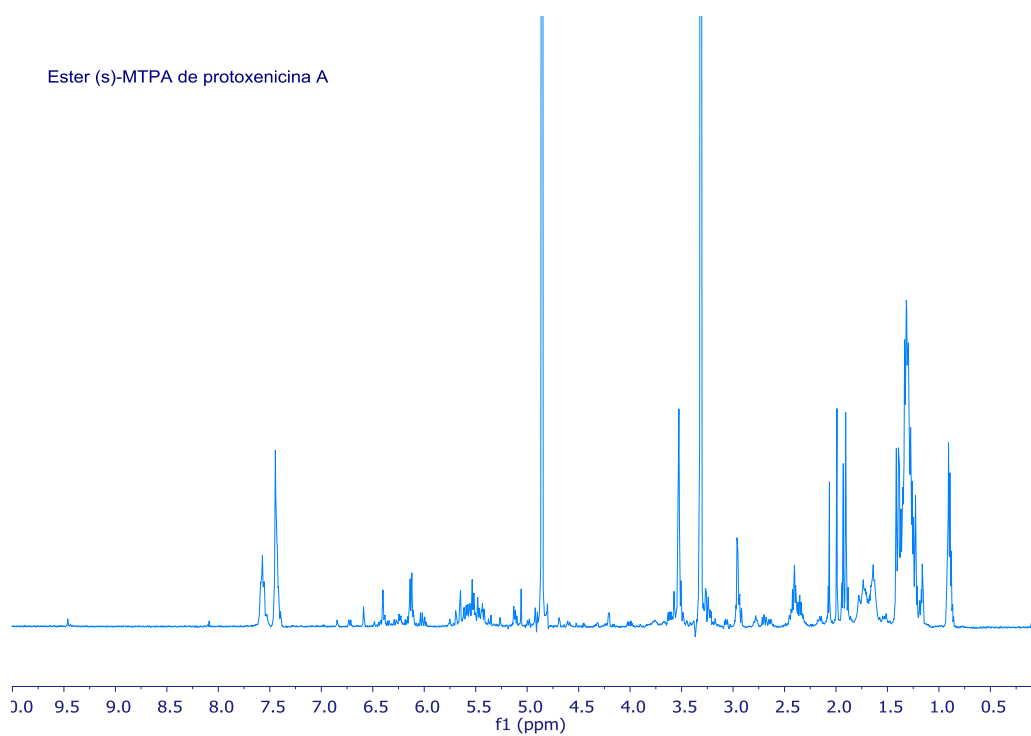
(+)-HRES-TOFMS m/z 637.3643 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_{11}$, 637.3640)

Experimento	Figura N.º	Tabla N.º	Página N.º
RMN ^1H	71		97
RMN ^{13}C	70		96
Datos RMN		9	98
RMN COSY	74		100
RMN HSQC	72		97
RMN HMBC	73		99

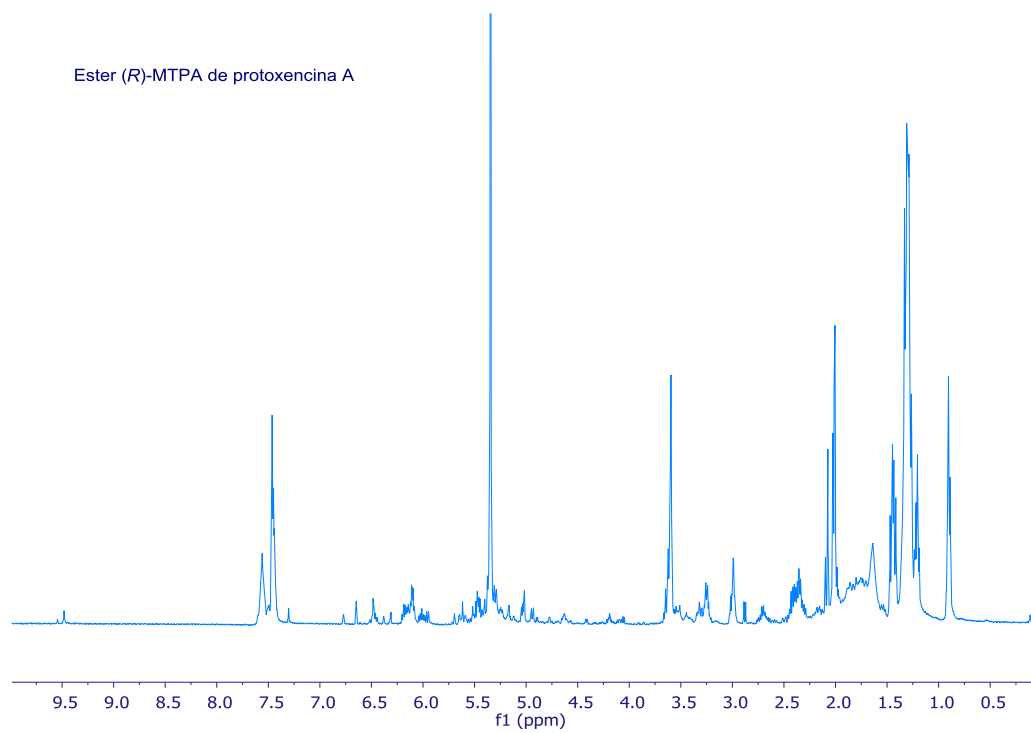


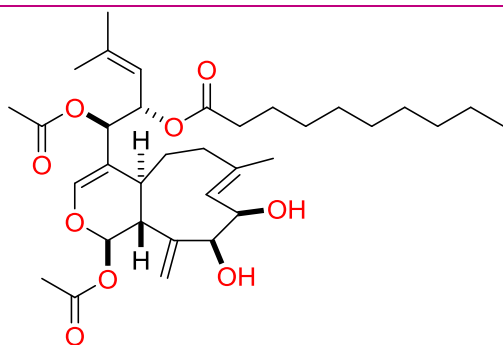
3a R=(S)-MTPA
3b R=(R)-MTPA

Ester (S)-MTPA de Protoxenicina A (3a):



Ester (R)-MTPA de Protoxenicina A (3b):

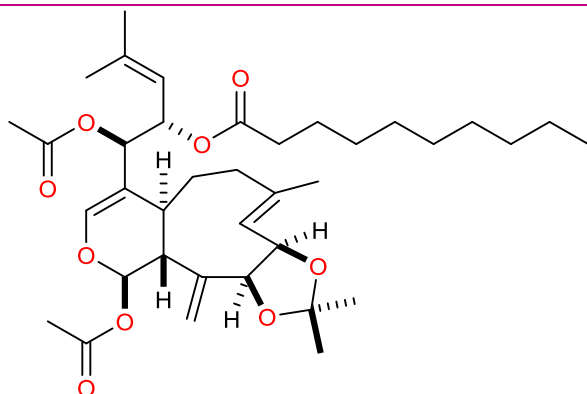


**Protoxenicina B (4)****Protoxenicina B (4):**

Sólido incoloro

 $[\alpha]_D^{25} -5.5$ (c 0.83, MeOH)UV (MeOH)= λ_{\max} 220 nmIR (ATR) ν_{\max} = 3472, 2929, 2856, 1741, 1665, 1455, 1416, 1373, 1231, 1206, 1160, 1042, 959, 892, 838, 790 cm^{-1} (+) -HRES-TOFMS m/z 627.3531 $[M + Na]^+$ (calcd. for $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_9\text{Na}$, 627.3509)

Experimento	Figura N.º	Tabla N.º	Página N.º
RMN ^1H	83		108
RMN ^{13}C	84		109
Datos RMN		10	112
RMN COSY	88		114
RMN HSQC	85, 86		110
RMN HMBC	87		113
RMN ROESY	94		119



Acetónido de Protoxenicina B (4a)

Acetónido de Protoxenicina B (4a):

Experimento	Figura N.º	Tabla N.º	Página N.º
RMN ^1H	95, 96		121
RMN ^{13}C	97, 98		123
Datos RMN		11	122
RMN COSY	101, 102		125
RMN HSQC	99, 100, 107		124, 128
RMN HMBC	103, 104		126
RMN ROESY	105, 106, 108		127, 129

7.5 Parte experimental Capítulo 5

Recolección de la muestra: El tunicado *Lissoclinum bistratum* se recolectó a mano mediante buceo en Raja Ampat, Indonesia (05° 33.353' S/ 130° 41.156' E) a una profundidad entre 1 y 8 metros en abril de 2007 y se congeló inmediatamente después de su recolección. Un trozo de la muestra (ORMA48136) está depositada en PharmaMar. La identificación taxonómica de esta esponja fue realizada por el Dr Xavier Turón (CEAB-Centro de Estudios Avanzados de Blanes, España).

Extracción y fraccionamiento: Una muestra de *Lissoclinum bistratum* (75 g) se trituró y se extrajo tres veces con una mezcla CH₃OH:CH₂Cl₂ (50:50, 3 × 500 mL). Se obtuvo 2.6 g del extracto orgánico que se fraccionó mediante VFC con un gradiente desde H₂O a CH₃OH y finalizando con CH₂Cl₂.

Fracción	RP1	RP2	RP3	RP4	RP5	RP6	RP7
Disolvente	H ₂ O	H ₂ O:CH ₃ OH (3:1)	H ₂ O:CH ₃ OH (1:1)	H ₂ O:CH ₃ OH (1:3)	CH ₃ OH	CH ₃ OH: CH ₂ Cl ₂ (1:1)	CH ₂ Cl ₂
Volumen (mL)	200	200	200	200	200	200	200
Cantidad (mg)	1900	187	41.4	22.7	351	47.2	4.4

La fracción eluída con CH₃OH (RP5: 351 mg) se separó mediante HPLC semipreparativo en una columna Waters XBridge C₁₈ (5 μm, 10 × 150 mm), con un gradiente desde 33% a 73% de CH₃CN en H₂O con 0.1% TFA en 20 min y un flujo de 5 mL/min. De las fracciones H2 y H124 eluidas con unos tiempos de retención de 15.1 y 9.5 min, se obtuvieron los compuestos **5** (10 mg) y **6** (2 mg), respectivamente.

Fracción	H1	H2	H3	H4	H5	H6
Cantidad (mg)	1.8	6.0	1.9	3.4	7.9	16.7

Configuración absoluta del residuo de alanina en bistratamida M y N: A una disolución de 0.2 mg de **5** y **6** en 3 mL de diclorometano se hizo pasar una corriente de ozono durante 5 min. A continuación, se secó el disolvente bajo corriente de nitrógeno y se adicionó 0.5 mL de HCl 6N a 110° C durante 18 horas. Transcurrido ese tiempo, el producto obtenido se secó bajo corriente de nitrógeno y se adicionó 100 μL of H₂O, 0.4 mg of 1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-L-alaninamida (L-FDAA, reactivo de Marfey) en 100 μL de acetona y 40 μL de NaHCO₃ 1 M. La mezcla resultante se calentó

a 40°C durante una hora. A continuación, se enfrió hasta 23 °C y finalizó la reacción con la adición de HCl 2 N (100 µL). El producto resultante se secó y se disolvió en 660 µL de H₂O. Cada alícuota fue analizada por HPLC/MS utilizando una columna Waters Symmetry, 150 × 4.6 mm, 5 µm y con un gradiente de 25% a 50 % CH₃CN en H₂O con 0.04% TFA en 30 min y un flujo de 0.8 mL/min.

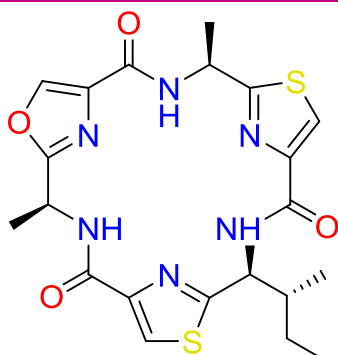
Residuo	Alanina
<i>t_R</i> (min) en 5	14.1
<i>t_R</i> (min) en 6	14.3, 16.8

Análisis de la configuración de la isoleucine comercial mediante el empleo del método avanzado de Marfey: 0.3 mg de una mezcla de L-Ile and D-*allo*-Ile comercial (Sigma I2877) se hizo reaccionar con una mezcla 1:1 de L-FDAA and D-FDAA de la misma forma que la descrita para el caso de *N*-Me-Ile. Se obtuvieron 4 estereoisómeros que fueron analizados por HPLC/MS usando una columna Phenomenex, Lux Cellulose-4 (250 × 4.6 mm, 5 µm, 100 Å), empleando como fase móvil un gradiente isocrático de 35% de CH₃CN en H₂O con 0.1% TFA durante 50 min y un flujo de 1 mL/min.

Residuo	L-Ile	L- <i>allo</i> -Ile	D-Ile	D- <i>allo</i> -Ile
<i>t_R</i> (min)	33.9	27.9	31.4	36.0

Tritación de bistratamida K: A una disolución de 3 mg de **7** en 0.75 mL de CD₃CN (deuterado) en un tubo de RMN se añadió 0.2 equivalentes de una

disolución de ZnCl_2 en CD_3CN hasta llegar a un total de cuatro equivalentes. En cada adición se realizaron experimentos de RMN ^1H y ^{13}C .



Bistratamida M (5)

Bistratamida M (5):

Sólido incoloro

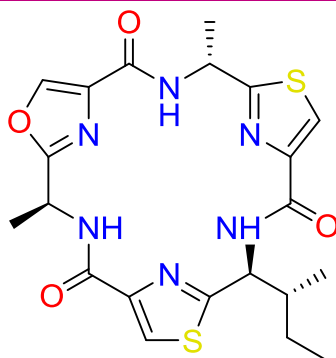
$[\alpha]_D^{25}$ 40.2 (c 1.4, MeOH)

UV (MeOH)= λ_{max} 202 nm

IR (ATR) ν_{max} = 3396, 2969, 2932, 1678, 1604, 1496, 1208, 1142, 845, 802, 726 cm^{-1}

(+)-HRES-TOFMS m/z 489.1405 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}_2$, 489.1373)

Experimento	Figura N.º	Tabla N.º	Página N.º
RMN ^1H	120		148
RMN ^{13}C	119		147
Datos RMN		14	150
RMN COSY	123		153
RMN HSQC	121		151
RMN HMBC	122, 124		151, 154

**Bistratamida N (6)****Bistratamida M (6):**

Sólido incoloro

 $[\alpha]_D^{25}$ 9.6 (c 1.1, MeOH)UV (MeOH)= λ_{\max} 202 nmIR (ATR) ν_{\max} = 3395, 2969, 2932, 1678, 1604, 1541, 1496, 1208, 1143, 845, 803, 726 cm^{-1} (+)HRES-TOFMS m/z 489.1383 $[M + H]^+$ (calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}_2$, 489.1373)

Experimento	Figura N.º	Tabla N.º	Página N.º
RMN ^1H	131		160
RMN ^{13}C	130		160
Datos RMN		16	162
RMN COSY	134		164
RMN HSQC	132		163
RMN HMBC	133		163

7.6 Parte experimental Capítulo 6

Recolección de la muestra: La esponja *Dadalopecta* sp. se recolectó a mano mediante sistema de rebreather en la isla de Alor, Indonesia (08° 19.641' S / 124° 19.994' E) a una profundidad de 95 metros en agosto de 2013 y se congeló inmediatamente después de su recolección. Un trozo de la muestra (ORMA123604) está depositada en PharmaMar. La

identificación taxonómica de esta esponja fue realizada por la Dra. María Jesús Uriz del Centro de Estudios Avanzados de Blanes (CEAB).

Extracción y fraccionamiento: Una muestra de *Daedalopelta* sp. (70 g) se trituró y se extrajo tres veces con una mezcla CH₃OH:CH₂Cl₂ (50:50, 3 × 400 mL). Se obtuvo 1.7 g del extracto orgánico que se fraccionó mediante VFC con un gradiente desde H₂O a CH₃OH y finalizando con CH₂Cl₂.

Fracción	RP1	RP2	RP3	RP4	RP5	RP6	RP7
Disolvente	H ₂ O	H ₂ O:CH ₃ OH (3:1)	H ₂ O:CH ₃ OH (1:1)	H ₂ O:CH ₃ OH (1:3)	CH ₃ OH	CH ₃ OH: CH ₂ Cl ₂ (1:1)	CH ₂ Cl ₂
Volumen (mL)	200	200	200	200	200	200	200
Cantidad (mg)	1269	158	69.2	21.3	56.0	83.1	7.6

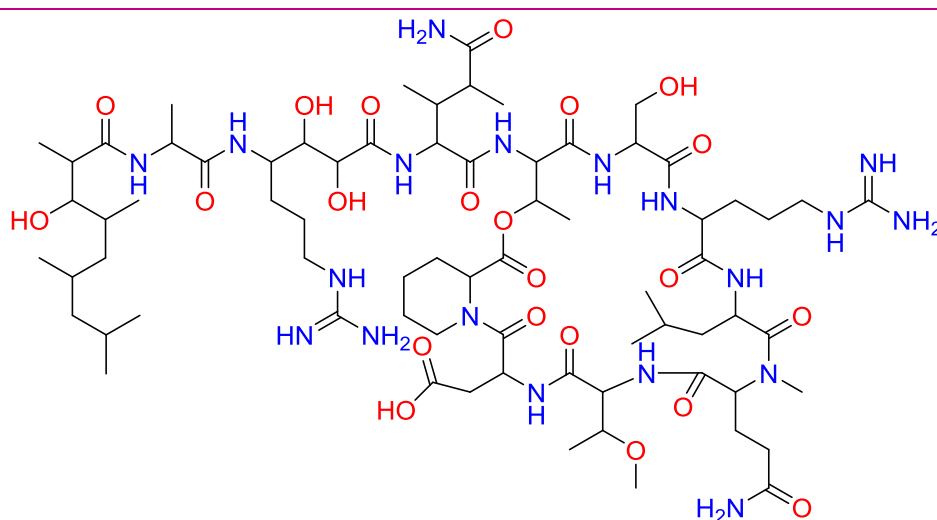
La fracción eluída con CH₃OH (RP5: 56.0 mg) se separó mediante HPLC semipreparativo en una columna Waters Symmetry C₁₈, (μm, 7.8 × 150 mm), con un gradiente desde 30% a 50% de CH₃CN en H₂O con 0.1% TFA en 20 min y un flujo de 5 mL/min. De la fracción H4 eluida con un tiempo de retención de 12.4 min se obtuvo el compuesto **7** (4.0 mg) .

Fracción	H1	H2	H3	H4	H5
Cantidad (mg)	3.6	0.9	2.3	4.0	5.7

Análisis de la configuración de los aminoácidos mediante el empleo del método de Marfey: A una disolución de 0.4 mg del compuesto **8** en diclorometano (3 mL), se hizo burbujear una corriente de ozono en oxígeno durante 5 min. EL disolvente se eliminó bajo corriente de N₂ y al producto resultante se adicionó 0.5 mL de 6N HCl. La mezcla resultante se calentó a 110 °C durante 18 h. A continuación, el producto obtenido se

secó mediante corriente de N₂ y se adicionó 100 µL of H₂O, 0.4 mg of 1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-L-alaninamida (L-FDAA, reactivo de Marfey) en 100 µL de acetona y 40 µL de NaHCO₃ 1 M. La mezcla resultante se calentó a 40 °C durante una hora, se enfrió hasta 23 °C y se quencheofinalizó la reacción con la adición de HCl 2 N (100 µL). Se secó y se disolvió en 660 µL de H₂O. Cada alícuota fue analizada por HPLC/MS utilizando una columna Waters Symmetry (150 × 4.6 mm, 5 µm) y usando como fase un móvil un gradiente de 20% a 50 % CH₃CN en H₂O con 0.04% TFA en 30 min y un flujo de 0.8 mL/min.

Residuo	Alanina	Serina	Leucina	Treonina
t _R (min) en 7	14.1	6.9	25.8	8.4
Residuo	N-Me-Glutamina	Ácido aspártico	Arginina	Ácido pipercolico
t _R (min) en 7	38.6	12.5	6.7	22.9



Daedophamida (8)

Daedophamida (8):

Sólido incoloro

[α]_D²⁵ 6.3 (c 0.46, MeOH)

UV (MeOH)= λ_{max} 200 nm

IR (ATR) ν_{max} = 3335, 2958, 1658, 1531, 1455, 1202, 837, 801, 721 cm^{-1}

(+)-HRES-TOFMS m/z 1596.9439 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{71}\text{H}_{125}\text{N}_{19}\text{O}_{22}$, 1596.9319)

Experimento	Figura N.º	Tabla N.º	Página N.º
RMN ^1H	156		194
RMN ^{13}C	157		194
Datos RMN		19	195
RMN COSY	159		197
RMN HSQC	158		196
RMN HMBC	160, 169, 170		197, 205, 206
RMN TOCSY	162, 163		199, 200
RMN ROESY	161		198

COMUNICACIONES EN CONGRESOS

Determination of the stereochemistry of bistratamide N

Carlos Jiménez, Carlos Urda, Marta Pérez, Rogelio Fernández, Jaime Rodríguez y Carmen Cuevas.

XXXV Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química, 19-23 de Julio de 2015, La Coruña (comunicación oral).

Two new xenicanes from the soft coral *clavularia* sp.

Carlos Jiménez, Carlos Urda, Marta Pérez, Rogelio Fernández, Jaime Rodríguez y Carmen Cuevas.

9th European Conference on Marine Natural Products 30 Agosto-2 Septiembre de 2015, Glasgow (Poster).

PM070280, un péptido lineal n-metilado aislado de la esponja *cribrochalina* sp.

Carlos Urda, Marta Pérez, Rogelio Fernández, Jaime Rodríguez, Carlos Jiménez, and Carmen Cuevas

XXVI Reunión Bienal de Química Orgánica, 14-17 Junio 2016, Punta Umbría (Huelva) (Poster).

Protoxenicin A y B nuevos xenicanos citotóxicos esterificados con un ácido graso saturado

Carlos Jiménez, Carlos Urda, Marta Pérez, Rogelio Fernández, Jaime Rodríguez y Carmen Cuevas.

XXXVI Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química, 25-29 de Junio de 2017, Sitges (comunicación oral).

REVISTAS CIENTÍFICAS

Pembamide, a n-methylated linear peptide from a sponge *cribrochalina* sp.

Carlos Urda, Marta Pérez, Jaime Rodríguez, Carlos Jiménez, Carmen Cuevas y Rogelio Fernández

Tetrahedron Letters, , 2016, Volume 57, Issue 30, pp 3239–3242

Protoxenicins A and B, Cytotoxic Long-Chain Acylated Xenicanes from the Soft Coral *Protodendron repens*

Carlos Urda, Rogelio Fernández, Marta Pérez, Jaime Rodríguez, Carlos Jiménez y Carmen Cuevas

Journal of Natural Products, 2017, Volumen 80, pp 713–719

Bistratamides M and N, oxazole-thiazole containing cyclic hexapeptides isolated from *Lissoclinum bistratum*. Interaction of zinc (II) with bistratamide K

Carlos Urda, Rogelio Fernández, Jaime Rodríguez, Marta Pérez, Carlos Jiménez y Carmen Cuevas

Manuscrito enviado para su publicación

Daedophamide A, a Cytotoxic Cyclodepsipeptide from the Indonesian Sponge *Daedalopelta* sp.

Carlos Urda, Rogelio Fernández, Jaime Rodríguez, Marta Pérez, Carlos Jiménez y Carmen Cuevas

Manuscrito enviado para su publicación

Njaoamine I, a cytotoxic polycyclic alkaloid from the haplosclerid sponge *Reniera* sp.

Carlos Urda, Rogelio Fernández, Jaime Rodríguez, Marta Pérez, Carlos Jiménez y Carmen Cuevas. Manuscrito enviado para su publicación



Pembamide, a *N*-methylated linear peptide from a sponge *Cribrochalina* sp.



Carlos Urda^a, Marta Pérez^a, Jaime Rodríguez^b, Carlos Jiménez^b, Carmen Cuevas^{a,*}, Rogelio Fernández^{a,*}

^a Medicinal Chemistry Department, PharmaMar S.A., Pol. Ind. La Mina Norte, Avenida de los Reyes 1, 28770 Colmenar Viejo (Madrid), Spain

^b Departamento de Química Fundamental, Faculdade de Ciências e Centro de Investigações Científicas Avanzadas (CICA), Universidade da Coruña, 15071 A Coruña, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 April 2016

Revised 11 May 2016

Accepted 13 May 2016

Available online 14 May 2016

Keywords:

Cribrochalina

Isolation

Peptide

Advanced Marfey's method

Pembamide

ABSTRACT

A new highly *N*-methylated linear peptide, pembamide (**1**), has been isolated from the marine sponge *Cribrochalina* sp. (family Niphatidae) collected off the coast of Pemba (Tanzania). The planar structure of **1** was assigned on the basis of extensive 1D and 2D NMR spectroscopy and mass spectrometry. The absolute configuration of the amino acid residues in **1** was determined by application of the Advanced Marfey's method. Compound **1** displayed significant cytotoxicity against three human tumor cell lines with GI₅₀ values in the micromolar range.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Numerous studies on *N*-methylamino acids (NMA) containing peptides¹ reveal that replacing natural amino acids with *N*-methylated analogs produce changes in the pharmacokinetic properties by blocking the proteolytic cleavage sites,^{2,3} decreasing the number of hydrogen bonds, increasing lipophilicity and, in many cases, enhancing membrane permeability,^{4–6} as well as altering the conformational characteristics or properties of the amide bonds.^{7–9} Thus, cyclic *N*-methylamino acids such as vancomycin, cyclosporine, and actinomycin D isolated from microorganisms have found clinical use in part due to the physical properties and chemical stability conferred by the NMA present in their structures.^{10–12}

Highly *N*-methylated linear peptides have also been isolated from different marine sources. Thus, koshikamides¹³ are peptides with four or more *N*-methylamino acids isolated from the marine sponge *Theonella* sp. Dictyonamide A,¹⁴ was isolated from the fungus K063 separated from the red alga *Ceratodictyon spongiosum*, while the linear octapeptides RHM-1 and RHM-2¹⁵ were obtained from a marine sponge-derived fungus *Acremonium* sp. Marine cyanobacteria are also sources of this type of compounds. For instance, apramides A–G,¹⁶ dragonamides A–E,^{17–21} almiramides A–C,²² carmabin A,²³ dragomabin,²³ and kurahyne²⁴ have been isolated from the marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula* while

micromide²⁵ was found from a species belonging to the genus *Symploca*.

On the other hand, marine sponges belonging to the genus *Cribrochalina* sp. have been found to contain a variety of structurally unique metabolites with interesting biological activities. These include the polyacetylenic alcohol duryne²⁶ that inhibits the growth of several human tumor cell lines including leukemia, colon, lung, gastric, and breast cancers, and the kapakahines,²⁷ a family of cyclic peptides. Other studies have been related with marine alkaloids such as the manzadin family of bromopyrrole alkaloids,²⁸ pyrinadine A²⁹ which was the first pyridine alkaloid isolated from natural sources with an azoxy moiety and showed cytotoxic activity against L1210 murine leukemia and KB human epidermoid carcinoma cells in vitro. Also the tetrahydroisoquinoline cribrostatins 1–5, some of them displaying cytotoxic, antibacterial, and antifungal activities,³⁰ were found in *Cribrochalina* species.

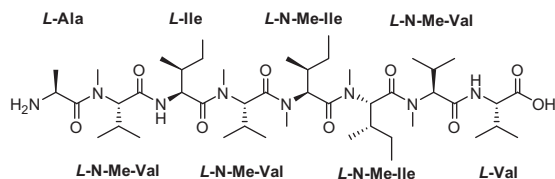
Results and discussion

As part of our ongoing efforts to find novel antitumor agents from marine organisms,³¹ a detailed biological investigation of a specimen of the Tanzanian sponge *Cribrochalina* sp. was undertaken. Preliminary data from the extracts of this sponge displayed cytotoxic activity against the human tumor cell lines A-549 (lung), HT-29 (colon), and MDA-MB-231 (breast). Bioassay-guided fractionation of the active organic extract of this sample resulted in

* Corresponding authors. Tel.: +34 91 823 4664; fax: +34 91 846 6001.

E-mail address: rfernandez@pharmamar.com (R. Fernández).

the isolation of a new highly *N*-methylated linear peptide which was named as pembamide (**1**). This compound shows significant cytotoxicity toward different human cancer cells.



Pembamide (**1**)

A sample of the marine sponge *Cribrochalina* sp. collected by hand off the coast of Pemba Island, north of Tanzania, was extracted several times using CH₂Cl₂/MeOH (1:1). The crude extract was subsequently fractionated by vacuum flash chromatography (VFC) on Lichoprep RP-18 using a gradient mixture of H₂O, MeOH, and CH₂Cl₂ with decreasing polarity. Bioguide fractionation against the former human tumor cell lines afforded an active fraction eluted with 100% MeOH that was subjected to reversed-phase HPLC to yield **1**.

Pembamide (**1**) was obtained as a colorless amorphous solid. The molecular formula of compound **1** was determined to be C₄₆H₈₆N₈O₉ (8 degrees of unsaturation) based on the [M+H]⁺ ion peak at *m/z* 895.6596 observed in the (+)-HRESI-TOFMS and on NMR data. A peptidic structure was evident from the NMR data in CD₃OD (Table 1). The ¹H NMR spectrum of **1** revealed the presence of five tertiary *N*-methyl amide singlets at δ_H 3.16, 3.15, 3.09, 3.08, and 3.05, as well as a characteristic secondary amide NH doublet at δ_H 8.07 (deuterium exchangeable). Also, the presence of eight low-fielded signals (δ_H 5.32–4.30) assigned to the α -protons

of amino acids and 15 methyl groups between 1.45 and 0.77 ppm were representative of alkyl amino acids residues. Moreover, the ¹³C NMR spectrum of **1** exhibits eight carbonyl carbons at δ_C 174.6, 174.3, 172.9, 172.2, 172.1, 172.0, 171.8, and 171.2 attributable to ester/amide functionalities and five *N*-methyl groups at δ_C 31.8, 31.4, 31.3, 31.2, and 31.0. Further examination of the ¹³C NMR data showed the presence of eight carbons resonating in the δ_C 64.0–49.0 ppm range, and 25 signals in the high-field region, supporting the alkyl nature of the side chains of the amino acid residues.

2D NMR experiments of **1**, including COSY, TOCSY, and edited-HSQC, established the presence of eight spin systems (Fig. 1), three of which belong to the common amino acids alanine, valine, and isoleucine. The identification of the remaining fragments was based on the long range HMBC correlations detected between *N*-methyl groups and the corresponding α -protons of the amino acid residues. Thus, two *N*-methylated isoleucines were deduced by the presence of two HMBC cross peaks between the *N*-Me at δ_H 3.05 and C-2 at δ_C 58.0 ppm (*N*-Melle-1) and between the *N*-Me at δ_H 3.09 and C-2 at δ_C 58.1 (*N*-Melle-2). In the same way, long range correlations from three *N*-Me groups at δ 3.08, 3.16, and 3.15 ppm to the corresponding C-2 at δ_C 64.1, 59.7, 63.8, respectively, allowed us to identify the remaining amino acids as *N*-methyl valines (*N*-MeVal-1, *N*-MeVal-2, and *N*-MeVal-3), thereby accounting for all 8 degrees of unsaturation and signifying an overall linear arrangement.

A combination of HMBC and ROESY data allowed us to determine the sequence of these units. Thus, long range correlations from α -protons or *N*-Me groups to the carbonyl carbons of adjacent amino acids, plus ROESY correlations between the α -protons and the *N*-Me protons allowed us to establish the sequence as Ala-*N*-MeVal-1-Ile-*N*-MeVal-2-*N*-Melle-1-*N*-Melle-2-*N*-MeVal-3-Val as shown as in Figure 1.

The mass fragmentation pathways observed in ESIMS/MS of **1** confirmed the proposed sequence (Fig. 2). Thus, the peaks at *m/z*

Table 1
NMR data of **1** in CD₃OD (500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C)

Amino acid	Pos.	δ_C , mult.	δ_H , mult., <i>J</i> in Hz	Amino acid	Pos.	δ_C , mult.	δ_H , mult., <i>J</i> in Hz
Ala	NH ₂	—	—	<i>N</i> -Melle-1	NMe	31.3, CH ₃	3.05, s
	1	171.8, C	—		1	172.1, C	—
	2	49.0, CH	4.42, q, 7.0		2	58.0, CH	5.32, d, 11.5
	3	16.4, CH ₃	1.45, d, 7.0		3	34.5, CH	2.09, m
					4	25.3, CH ₂	1.23, m; 0.96, m
					5	19.6, CH ₃	0.85 ^a
					6	11.0, CH ₃	0.85 ^a
<i>N</i> -MeVal-1	NMe	31.0, CH ₃	3.08, s	<i>N</i> -Melle-2	NMe	31.4, CH ₃	3.09, s
	1	171.2, C	—		1	172.9, C	—
	2	64.1, CH	4.65, d, 12.5		2	58.1, CH	5.30, d, 12.0
	3	27.4, CH	2.26, m		3	34.8, CH	2.13, m
	4	15.8, CH ₃	0.89, d, 6.5		4	25.2, CH ₂	1.23, m; 0.96, m
	5	18.9, CH ₃	0.87, d, 6.5		5	19.0, CH ₃	0.85 ^a
					6	11.0, CH ₃	0.86 ^a
Ile	NH	—	—	<i>N</i> -MeVal-3	NMe	31.8, CH ₃	3.15, s
	1	174.6, C	—		1	174.3, C	—
	2	54.6, CH	4.70, d, 8.5		2	63.8, CH	4.70, d, 9.0
	3	37.8, CH	1.86, m		3	27.8, CH	2.24, m
	4	25.5, CH ₂	1.52, m; 1.17, m		4	19.7, CH ₃	0.96, d, 6.5
	5	18.2, CH ₃	0.92, d, 7.0		5	19.0, CH ₃	0.77, d, 6.5
	6	10.9, CH ₃	0.89, t, 7.5				
<i>N</i> -MeVal-2	NMe	31.2, CH ₃	3.16, s	Val	NH	—	8.07, d, 7.0 ^b
	1	172.2, C	—		1	172.0, C	—
	2	59.7, CH	5.22, d, 11.0		2	59.0, CH	4.30, d, 5.5
	3	28.6, CH	2.33, m		3	31.7, CH	2.16, m
	4	15.8, CH ₃	0.88, d, 6.0		4	19.6, CH ₃	0.92, d, 6.5
	5	18.6, CH ₃	0.80, d, 6.5		5	19.8, CH ₃	0.92, d, 6.5

^a Signal overlapped. Multiplicity and coupling constant could not be determined.

^b Signal deuterium exchangeable.

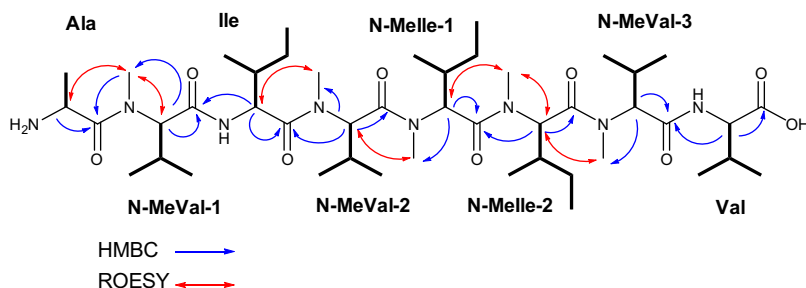


Figure 1. Selected ROESY (red) and HMBC (blue) and COSY (bold bonds) correlations for **1**.

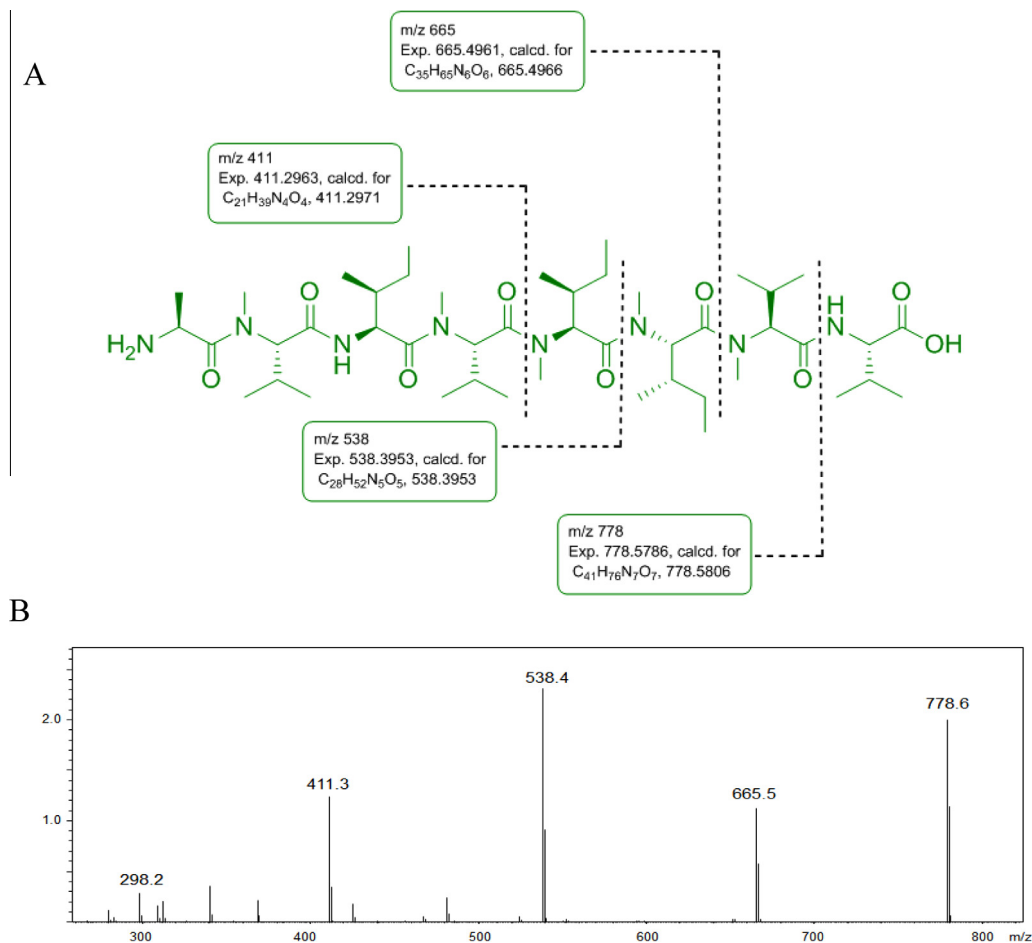


Figure 2. (A) Fragmentation pathway of pempamide (**1**) along with the (+)-HRESIMS/TOF of the fragments. (B) MS/MS ESI fragmentation at (m/z) = 778.6.

298 (Ala/*N*-MeVal-1/Ile), 411 (Ala/*N*-MeVal-1/Ile/*N*-MeVal-2), 538 (Ala/*N*-MeVal-1/Ile/*N*-MeVal-2/*N*-Melle-1), 665 (Ala/*N*-MeVal-1/Ile/*N*-MeVal-2/*N*-Melle-1/*N*-Melle-2), and 778 (Ala/*N*-MeVal-1/Ile/*N*-MeVal-2/*N*-Melle-1/*N*-Melle-2/*N*-MeVal-3) displayed in the MS/MS experiment of **1** were used to confirm the former proposed sequence. The molecular formula of those fragments was confirmed by HRESIMS/TOF (Fig. 2).

The absolute configuration of all units in **1** was established as *L* using the Advanced Marfey Method.^{32,33} Acid hydrolysis of **1** was subjected to Marfey's derivatization with 1-fluoro-2-4-dinitrophenyl-5-*L*-alanine amide (*L*-FDAA) and racemic *D,L*-FDAA separately, and then analyzed by LC/MS. After comparing both chromatograms, we could assign the *L*-configurations to valine, alanine, and the three *N*-Me-valines. Since *N*-Me-*L*-Val and *L*-Ile have the same molecular weight, these two amino acids were distin-

guished by their UV spectrum.³⁴ Although Marfey's analysis clearly suggested the *L*-configuration of the *N*-Melle moieties, we were unable to distinguish *N*-Me-*L*-Ile and *N*-Me-*L*-allo-Ile by this method due to lack of a standard of *N*-Me-*L*-allo-Ile. In order to distinguish between the *D*- and *L*-allo configurations in **1**, racemization of the *N*-Me-*L*-Ile standard was carried out, and the reaction mixture, containing both *N*-Me-*L*-Ile and *N*-Me-*D*-allo-Ile, was subjected to advanced Marfey's analysis using LC-MS. The retention times of *L*-Marfey derivatives of the *N*-Me-*L*-Ile standard and the *N*-Me-*L*-Ile units, in the hydrolysate of **1**, were identical. In the same way, we determined that the configuration for the remaining isoleucine was *L*-Ile instead of *L*-allo-Ile.

Cell proliferation assays against the human tumor cell lines A-549 (lung), HT-29 (colon), and MDA-MB-231 (breast) displayed that pempamide exhibited significant cytotoxic activity with a

Table 2
Cytotoxic Activity Data (μM) of **1**

Compound	Tumor cell lines			
		Breast, MDA-MB-231	Colon, HT-29	Lung, NSCLC A-549
Pembamide	GI ₅₀	3.35	3.80	2.46
	TGI	8.15	3.91	>11.2
	LC ₅₀	>11.2	4.13	>11.2
Doxorubicin	GI ₅₀	0.15	0.27	0.21
	TGI	0.50	0.86	0.85
	LC ₅₀	2.41	>17.2	>17.2

GI₅₀, compound concentration that produces 50% inhibition on cell growth as compared to control cells, TGI, compound concentration that produces total growth inhibition as compared to control cells, and LC₅₀, compound concentration that produces 50% cell death as compared to control cells.

GI₅₀ range at micromolar level (Table 2). As a positive standard antitumor compound, doxorubicin is usually included in our assays and it is tested in parallel to the compounds, following identical procedure. The results obtained with doxorubicin are included in the Table 2

In summary, a new *N*-methylated linear peptide, pembamide (**1**), with a structure of Ala-*N*-MeVal-1-Ile-*N*-MeVal-2-*N*-Melle-1-*N*-Melle-2-*N*-MeVal-3-Val, was isolated from an extract of a sponge *Cribrorchalina* sp., being the first time that this type of compound is isolated from specimens belonging to this genus. Application of the advanced Marfey's method has allowed us to determine its absolute configuration. This compound showed significant cytotoxic activity against three human tumor cell lines. As in the case of other linear *N*-methylated peptides that have been isolated from marine sources, such as the octapeptides RHM1 and RHM2, the true origin of the compounds may be from microorganisms living within the marine invertebrates.^{35,2a} As such, the actual source of pembamide remains to be determined.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the help of our PharmaMar colleagues, C. de Eguilior, and S. Bueno for collecting the marine samples, Dr. L. F. García for the design of the biological assays, Dr. S. Munt for revision of the manuscript, and Dr. S. González for performance of the NMR experiments. We also thank Dr. M. J. Uriz (CEAB-Centro de Estudios Avanzados de Blanes, Spain) for determining the sponge taxonomy. We also acknowledge Mr. P. J. Ruysenaars, The Pemba Channel Fishing Club, Shimoni (Kenya), Ministry of Livestock and Fisheries Development, Fisheries Department (Tanzania).

Supplementary data

Supplementary data (experimental procedure and ¹H, ¹³C, HSQC, COSY, HMBC, and ROESY NMR spectra of pembamide (**1**) along with its analysis by advance Marfey's method) associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.05.054>.

References and notes

- Adamska, A.; Kolesińska, B.; Kluczyk, A.; Kamiński, Z. J.; Janecka, A. *J. Pept. Sci.* **2015**, *21*, 807–810.
- (a) Desriac, F.; Jégou, C.; Balnois, E.; Brillet, B.; Le Chevalier, P.; Fleury, Y. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 3632–3660; (b) Turker, R. K.; Hall, M. M.; Yamamoto, M.; Sweet, C. S.; Bumpus, F. M. *Science* **1972**, *177*, 1203–1205.
- Cody, W. L.; He, J. X.; Reily, M. D.; Haleen, S. J.; Walker, D. M.; Reynier, E. L.; Stewart, B. H.; Doherty, A. M. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2228–2240.
- Gordon, D. J.; Tapp, R.; Meredith, S. C. *J. Pept. Res.* **2002**, *60*, 37–55.
- Payne, J. W. *J. Gen. Microbiol.* **1972**, *71*, 259–265.
- Mason, J. M.; Kokkon, N.; Stott, K.; Doig, A. *J. Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 526–532.
- Hess, S.; Ovadia, O.; Shalev, D. E.; Senderovich, H.; Qadri, B.; Yehezkel, T.; Salitra, Y.; Sheynis, T.; Jelinek, R.; Gilon, C.; Hoffman, A. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6201–6211.
- Haviv, F.; Fitzpatrick, T. D.; Swenson, R. E.; Nichols, C. J.; Mort, N. A.; Bush, E. N.; Diaz, G.; Bammert, G.; Nguyen, A.; Rhutase, N. S.; Nellans, H. N.; Hoffman, D. J.; Johnson, E. S.; Greer, J. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 363–369.
- Vitoux, B.; Aubry, A.; Cung, M. T.; Marraud, M. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, *27*, 617–632.
- Levine, D. P. *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *42*, S5–S12.
- Faulds, D.; Goa, K. L.; Benfield, P. *Drugs* **1993**, *45*, 953–1040.
- Watne, A. L.; Badillo, J.; Koike, A.; Kondo, T.; Moore, G. E. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1960**, *89*, 445–453.
- (a) Fusetani, N.; Warabi, K.; Nogata, Y.; Nakao, Y.; Matsunaga, S.; van Soest, R. M. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4687–4690; (b) Plaza, A.; Bifulco, G.; Masullo, M.; Lloyd, J. R.; Keffer, J. L.; Colin, P. L.; Hooper, J. N. A.; Bell, L. J.; Bewley, C. A. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4344–4355.
- Komatsu, K.; Shigemori, H.; Kobayashi, J. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6189–6192.
- Boot, C. M.; Tenney, K.; Valeriote, F. A.; Crews, P. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 83–92.
- Luesch, H.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Paul, V. J. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1106–1112.
- Jiménez, J.; Scheuer, P. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 200–203.
- Chen, H.; Feng, Y.; Xu, Z.; Ye, T. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 11132–11140.
- Mcphail, K. L.; Correa, J.; Linington, R. G.; Ortega-Barria, E.; Capson, T. L.; Gerwick, W. H. *J. Nat. Prod.* **2007**, 984–988.
- Gunasekera, S. P.; Ross, C.; Paul, V. J.; Matthew, S.; Luesch, H. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 887–890.
- Balunas, M. J.; Linington, R. G.; Tidgewell, K.; Fenner, A. M.; Ureña, L.; Togna, G. D.; Kyle, D. E.; Gerwick, W. H. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 60–66.
- Sanchez, L. M.; Lopez, D.; Vesely, B. A.; Togna, G. D.; Gerwick, W. H.; Kyle, D. E.; Linington, R. G. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4187–4197.
- Mcphail, K. L.; Correa, J.; Linington, R. G.; Gonzalez, J.; Ortega-Barria, E.; Capson, T. L.; Gerwick, W. H. *J. Nat. Prod.* **2007**, 984–988.
- Iwasaki, A.; Ohno, O.; Sumimoto, S.; Suda, S.; Suenaga, K. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 12840–12843.
- Williams, P. G.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Paul, V. J. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 49–53.
- Gung, B. W.; Omollo, A. O. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1067–1070.
- (a) Newhouse, T.; Lewis, C. A.; Baran, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6360–6361; (b) Nakao, Y.; Yeung, B. K. S.; Yoshida, W. Y.; Scheuer, P. J.; Kelly-Borges, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8271–8272.
- Ohfun, Y.; Oe, K.; Namba, K.; Shinada, T. *Heterocycles* **2012**, *85*, 2617–2649.
- Kariya, Y.; Kubota, T.; Fromont, J.; Kobayashi, J. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 997–998.
- Pettit, G. R.; Knight, J. C.; Collins, J. C.; Herald, D. L.; Pettit, R. K.; Boyd, M. R.; Young, V. G. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 793–798.
- (a) Poza, J. J.; Fernández, R.; Reyes, F.; Rodríguez, J.; Jimenez, C. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 7978–7984; (b) Santafe, G.; Paz, V.; Rodríguez, J.; Jimenez, C. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1161–1164; (c) Anta, C.; Gonzalez, N.; Santafe, G.; Rodríguez, J.; Jimenez, C. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 766–768.
- Harada, K.; Fujii, K.; Hayashi, K.; Suzuki, M.; Ikai, Y.; Oka, H. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3001–3004.
- Harada, K.; Fujii, K.; Mayumi, T.; Hibino, Y.; Suzuki, M.; Ikai, Y.; Oka, H. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1515–1518.
- Fujii, K.; Ikai, Y.; Mayumi, T.; Oka, H.; Suzuki, M.; Harada, K. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3346–3352.
- Cane, D. E.; Walsh, C. T. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, R319–R325.

Protoxeninicins A and B, Cytotoxic Long-Chain Acylated Xenicanes from the Soft Coral *Protodendron repens*Carlos Urda,[†] Rogelio Fernández,[†] Marta Pérez,^{*,†} Jaime Rodríguez,^{‡,ID} Carlos Jiménez,^{*,‡,ID} and Carmen Cuevas[†][†]Medicinal Chemistry Department, PharmaMar S. A., Pol. Ind. La Mina Norte, Avenida de los Reyes 1, 28770, Colmenar Viejo (Madrid), Spain[‡]Departamento de Química Fundamental, Facultade de Ciencias e Centro de Investigacións Científicas Avanzadas (CICA), Universidade da Coruña, 15071 A Coruña, Spain

S Supporting Information

ABSTRACT: Two new xenicanes, named protoxeninicins A (**1**) and B (**2**), were isolated from an organic extract of the soft coral *Protodendron repens*, collected off the coast of Okuza (Tanzania), being the first chemical study of an organism belonging to this genus. Their planar structures were determined by 1D and 2D NMR and HRESIMS techniques, while the relative configurations were elucidated by comparison of their chemical shifts and coupling constants with the literature values of their congeners, as well as by ROESY experiments, chemical derivatization, and molecular mechanics calculations. This is the first report of a xenicin acylated with a long saturated fatty acid. Furthermore, the absolute configuration of the stereogenic centers of the cyclononane ring and at C-1 in **1** was determined by Mosher's method. Protoxeninicin B (**2**) is present in solution as a mixture of two conformers in a 2:1 ratio deduced by ¹H NMR. Both xenicanes display significant cytotoxic activity against a panel of different tumor cell lines.

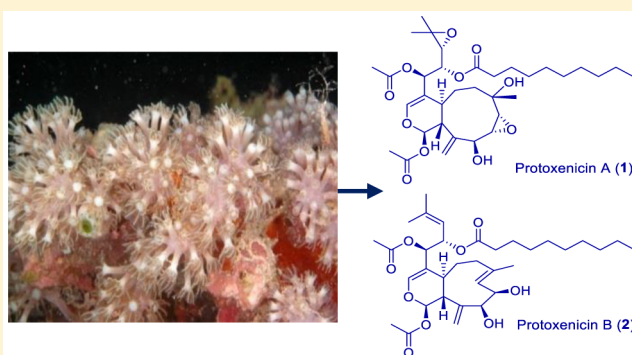


Figure 1. Frameworks of the family of *Xenia* diterpenoids.

new xenicanes, compounds **1** and **2**, which show significant cytotoxicity toward different human cancer cells.

Special Issue: Special Issue in Honor of Phil Crews

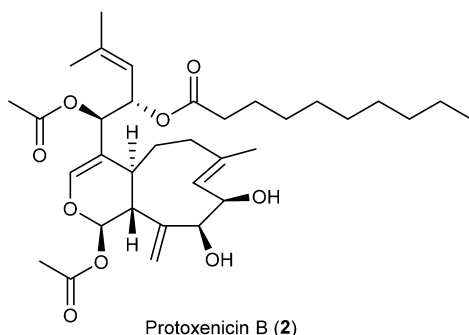
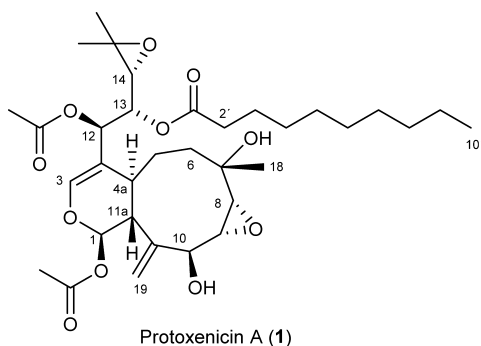
Received: January 17, 2017

Published: March 3, 2017

Natural products are a highly reliable and rich source of new anticancer entities. Over the past 36 years, nearly 63% of anticancer drugs introduced to the pharmaceutical market are natural products themselves or can be traced back to a natural product.¹ Soft corals belonging to the genus *Xenia* are well recognized as a rich source of bioactive secondary metabolites and especially diterpenoids with cytotoxic activity.² The xenicanes are a large class of mostly bicyclic marine diterpenoids featuring a cyclononane ring as a common structural denominator. The structures of xenicanes diterpenoids have been divided into four groups (Figure 1): the xenicins (containing an 11-oxabicyclo[7.4.0]tridecane ring system with an acetal functionality), the xeniolides (containing an 11-oxabicyclo[7.4.0]tridecane ring system with a lactone functionality), the xeniaphyllanes (with a bicyclo[7.2.0]undecane ring system), and the xeniaethers (containing an 11-oxabicyclo[7.3.0]dodecane ring system).³

As part of our ongoing efforts to find novel antitumor agents from marine organisms and more specifically from soft corals,⁴ specimens of *Protodendron repens* were investigated because preliminary data from the organic extracts displayed cytotoxic activity against the human tumor cell lines A-549 (lung), HT-29 (colon), and MDA-MB-231 (breast). Furthermore, no chemical study of a species of the *Protodendron* genus has been reported previously. Bioassay-guided fractionation of the active organic extract of this organism resulted in the isolation of two

Specimens of the soft coral *P. repens*, collected by hand off the coast of Okuza Island to the North of Tanzania, were extracted several times using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) to give an extract. This organic extract was subsequently fractionated by vacuum flash chromatography (VFC) on LiChroprep RP-18 using a gradient mixture of H_2O , MeOH , and CH_2Cl_2 with decreasing polarity. The resulting fractions were submitted to a bioassay against the previously detailed human tumor cell lines that allowed us to identify a very active fraction that was eluted with 100% MeOH . Reversed-phase HPLC separation of that active fraction yielded compounds **1** and **2**, named protoxenicens A and B, respectively.



Protoxenicin A (**1**) was obtained as a colorless, amorphous solid. The molecular formula of **1** was determined to be $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_{11}$ (nine degrees of unsaturation) based on the $[\text{M} + \text{H}]^+$ ion peak at m/z 637.3615 observed in its (+)-HRESI-TOF mass spectrum.

The ^{13}C NMR spectrum of **1** shows 34 signals (Table 1), which in combination with ^1H NMR and edited HSQC experiments indicated the presence of two acetyl groups ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 169.6, 25.3/1.61; 169.9, 21.0/1.89), one ester carbonyl group (δ_{C} 172.2), two double bonds (one exocyclic at δ_{C} 147.2 and δ_{C} 115.9/ δ_{H} 5.24 and 5.71 and another trisubstituted at δ_{C} 142.4 and δ_{C} 112.6/6.79), four oxygenated methines ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 92.9/6.45; 74.1/5.89; 70.8/5.40; 68.3/4.91), a nonprotonated carbon (δ_{C} 70.2), 10 methylenes, two additional methines, and four methyl groups. Furthermore, the presence of two epoxide groups was deduced from the three characteristic oxygenated methines at $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 63.1/2.36; 64.1/3.01 and 62.0/3.01 along with the characteristic nonprotonated carbon at δ_{C} 58.4 (confirmed by HMBC analysis).

Analysis of the COSY spectrum of compound **1** revealed the presence of four proton–proton spin systems (a–d), which are part of fragments A–D: (a) H-1/H-11a/H-4a/H-5/H-6; (b) H-8/H-9/H-10; (c) H-12/H-13/H-14; and (d) hydrocarbon-saturated chain between H-2'/H-10' (Figure 2). The structures of fragments A, C, and D were connected using an HMBC

experiment (see Figure 2). Thus, the HMBC correlations from H-3 to C-1, C-4, and C-4a and between H-1 and the carbonyl carbon of OAc-1, indicating that the ketal carbon C-1 is acetylated, allowed us to identify the presence of a 1-acetoxydihydropyran moiety and to complete the structure of fragment A. On the other hand, HMBC correlations from Me-16 and Me-17 protons to C-14 and C-15 carbons indicated that the structure of fragment C bears a dimethyl-trisubstituted epoxide group as depicted in Figure 2. Additionally, the HMBC correlation between H-12 and the carbonyl carbon of OAc-2 indicated the presence of an acetoxy group at C-12. Moreover, the HMBC correlation between H₂-2' protons and the C-1' ester carbonyl group shows that the hydrocarbon chain structure of fragment D corresponds to a decanoate moiety, deduced through the remaining atoms needed to satisfy the molecular formula.

In order to complete the planar structure of compound **1**, the former four fragments A–D were connected with the help of an HMBC experiment (Figure 3A). Fragment A was connected to fragment C through long-range correlations from H-12 to C-4 and H-3 to C-12. The connectivity between fragments A and B was established through the $\Delta^{11(19)}$ exocyclic double bond by HMBC cross-peaks from H₂-19 to C-10 and C-11a on one side and by long-range correlations from H₂-6 and H-8 to the oxygenated nonprotonated carbon C-7 on the other side. The former data allowed us to establish the presence in compound **1** of an 11-oxabicyclo[7.4.0]tridecane ring system with an acetylated ketal functionality similar to that found in other xenicane diterpenes possessing a xenic skeleton. Finally, fragments C and D were connected through HMBC correlation between H-13 and the carbonyl carbon C-1'.

Once the planar structure of **1** was established, its relative configuration was addressed. The 1R^* , 4aS^* , and 11aR^* relative configuration of the 1-acetoxydihydropyran ring and the 12R^* , 13R^* , and 14R^* of the side chain in **1** was deduced by comparison of its NMR spectroscopic data in C_6D_6 to those of helioxenicin A isolated from the blue coral *Heliopora coerulea*.⁵ The ROE correlation observed in **1** between H-4a and H-1 agrees with that relative configuration. The 7S^* , 8R^* , 9R^* , 10S^* relative configuration of the stereogenic centers located in the cyclononane ring in **1** was also determined from the ROESY experiment. Thus, correlations from Me-18 to H-9 and H-8 and this in turn to H-11a showed that these protons are located on the same face of the ring system, arbitrarily assigned as β , while correlations from H-10 to H-1 and H-4a displayed that these protons occurred on the opposite face (α) of the ring system (Figure 3B). Furthermore, the carbon and proton chemical shifts for positions C-5/C-9 along with the vicinal coupling constant corresponding to the 8,9-*cis* epoxide ring ($J_{\text{H}8/\text{H}9} = 4.0$ Hz) in **1** matched the data observed for helioxenicin A, having an identical C-5/C-9 fragment with the 7S^* , 8R^* , 9R^* relative configuration but lacking the hydroxy group at C-10. A conformational torsional sampling search using the MacroModel/Monte Carlo multiple minimum method afforded a conformer with a minimal energy that explains the NOE correlations observed in the ROESY spectrum of **1** (Figure 3B).

The absolute configuration of position 10 was determined by application of Mosher's method.⁶ Compound **1** was converted to the (S)- α -methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetyl (MTPA) ester (**1a**) and the (R)-MTPA ester (**1b**) by adding R-(–)- or S-(+)-MTPA chloride separately to a solution of **1** in pyridine- d_5 in an NMR tube, respectively. The ^1H NMR

Table 1. NMR Data of **1** in C₆D₆ and **2** in CD₂Cl₂ (500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C)

protoxinenicin A (1)			protoxinenicin B (2), major component		
position	δ_C , type	δ_H , mult. (<i>J</i> in Hz)	position	δ_C , type	δ_H , mult. (<i>J</i> in Hz)
1	92.9, CH	6.45, d (6.5)	1	92.9, CH	5.71, d (2.7)
3	142.4, CH	6.79, d (1.7)	3	142.3, CH	6.49, d (1.7)
4	112.6, C		4	115.8, C	
4a	31.5, CH	3.56, brs	4a	36.7, CH	1.99, m
5	27.0, CH ₂	1.71, m; 2.11, m	5	28.7, CH ₂	1.73, m; 2.04, m
6	32.2, CH ₂	1.46, m; 2.02, m	6	35.5, CH ₂	1.23, m; 2.50, m
7	70.2, C		7	137.1, C	
8	63.1, CH	2.36, d (4.4)	8	127.9, CH	5.53, d (10.8)
9	64.1, CH	3.01, m	9	73.3, CH	4.39, dd (10.8, 3.7)
10	68.3, CH	4.91, d (9.0)	10	80.2, CH	4.34, d (3.7)
11	147.2, C		11	151.9, C	
11a	45.7, CH	2.72, d (6.5)	11a	41.7, CH	3.01, brs
12	74.1, CH	5.89, d (7.3)	12	74.9, CH	5.24, d (6.2)
13	70.8, CH	5.40, dd (7.8, 7.3)	13	70.7, CH	4.63, dd (9.2, 6.2)
14	62.0, CH	3.01, d (7.8)	14	120.0, CH	5.14, dd (9.2, 1.3)
15	58.4, C		15	140.2, C	
16	19.4, CH ₃	1.38, s	16	26.1, CH ₃	1.75, s
17	24.3, CH ₃	1.10, s	17	19.0, CH ₃	1.75, s
18	29.5, CH ₃	1.22, s	18	20.1, CH ₃	1.73, s
19	115.9, CH ₂	5.24 s, 5.71 s	19	116.5, CH ₂	4.95, s; 5.06, s
1'	172.2, C		1'	173.0, C	
2'	34.4, CH ₂	2.21, m	2'	34.7, CH ₂	2.23, m
3'	25.3, CH ₂	1.60, m	3'	25.5, CH ₂	1.56, m
4'–7'	29.7–29.9, CH ₂	1.21–1.25, m	4'–9'	29.8, CH ₂	1.27, m
8'	32.3, CH ₃	1.28, m	10'	14.4, CH ₃	0.88, t (6.9)
9'	23.2, CH ₂	1.30, m	OAc-1	169.8, C	
10'	14.4, CH ₃	0.88, t (6.9)		21.4, CH ₃	2.03, s
OAc-1	169.6, C		OAc-12	170.4, C	
	25.3, CH ₃	1.61, s		21.4, CH ₃	1.98, s
OAc-12	169.9, C				
	21.0, CH ₃	1.89, s			

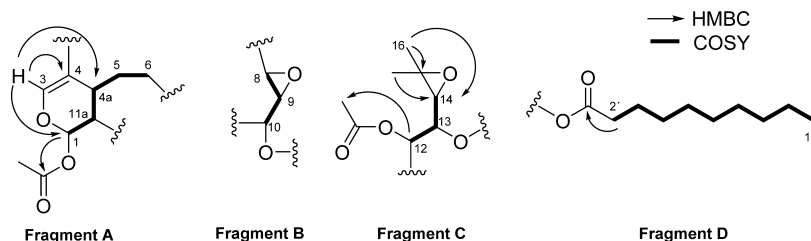


Figure 2. Structures of fragments A–D containing the four spin systems (a–d) deduced by COSY (displayed by bold bonds) in **1** and some key HMBC cross-peaks (arrows).

spectrum for each ester was measured, followed by calculation of chemical shift differences ($\Delta\delta = \delta_S - \delta_R$). The obtained differences were $\Delta\delta_H -0.01$ (H-1), -0.04 (H-4a), $+0.05$ (H-8), $+0.03$ (H-18), and -0.18 and -0.25 (H-19), indicating the *S*-configuration at C-10 (Figure 4). This information allowed us to determine the absolute configuration of the stereogenic centers of the cyclononane ring and at C-1 in **1** and to establish its configuration as 1*R*, 4a*S*, 7*S*, 8*R*, 9*R*, 10*S*, 11a*R*, 12*R**, 13*R**, 14*R**.

Protoxinenicin B (**2**) was obtained as a white, amorphous solid. Its molecular formula of C₃₄H₅₂O₉ was deduced from sodium adduct ion peak $[M + Na]^+$ at m/z 627.3531 from its (+)-HRESI-TOF mass spectrum, indicating nine degrees of unsaturation.

Although compound **2** displayed a single peak in the HPLC chromatogram and a single mass spectrum ion at m/z 627 $[M + Na]^+$, two sets of NMR signals in a 2:1 ratio are observed in its ¹H NMR spectrum. For that reason, first we focused our attention on the major component with a structure that seemed to be closely related to **1** by comparison of its NMR spectroscopic data (CD₂Cl₂, Table 1 and Table S1 in the Supporting Information) and mass spectra. The fact that the molecular formula of **2** differs from that of **1** by two fewer oxygen atoms along with the presence of four additional sp² carbons at δ_C 120.0, 127.9, 137.1, and 140.2 ppm in the ¹³C NMR spectrum of **2** suggested the existence of two additional double bonds in **2** instead of the two epoxide groups present in **1**.

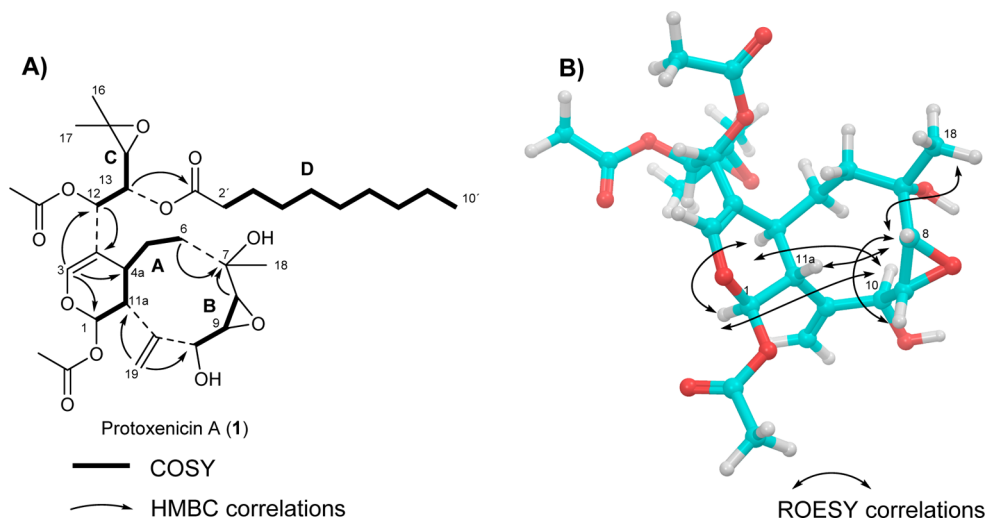


Figure 3. (A) COSY correlations (displayed by bold bonds) and key HMBC (arrows) connecting fragments A–D in **1**. (B) Key NOE correlations displayed in the most stable conformer found after a conformational search of **1** (C3'–C10' omitted for clarity).

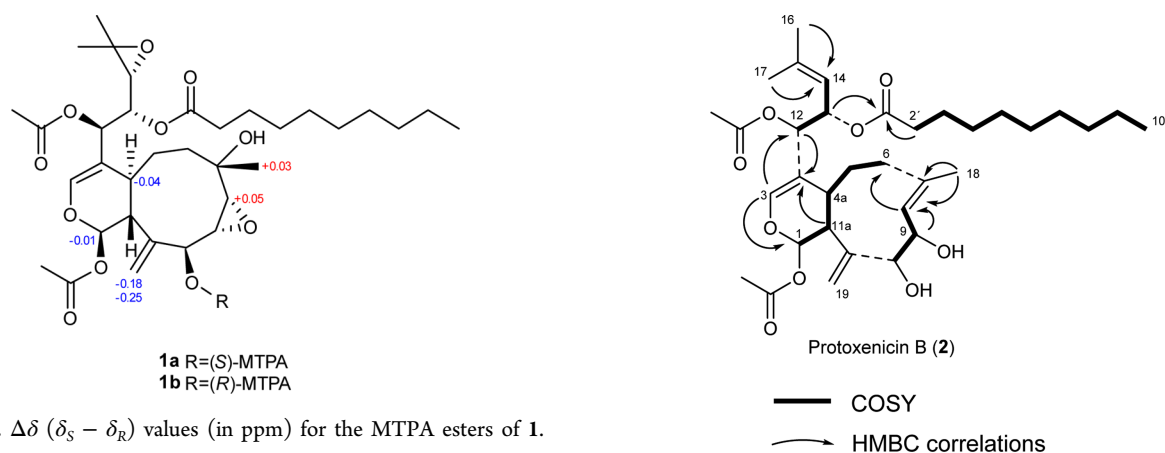


Figure 4. $\Delta\delta$ ($\delta_S - \delta_R$) values (in ppm) for the MTPA esters of **1**.

The presence of a trisubstituted Δ^{14} double bond in **2** instead of the epoxide group between C-14 and C-15 in **1** was deduced by HMBC correlation between the oxymethine proton H-12 (δ_H 5.24) and the olefinic methine carbon C-14 (δ_C 120.0) along with the long-range correlations between the Me-16 and Me-17 protons and the C-14 and C-15 olefinic carbons.

In a similar way, the additional Δ^7 double bond (δ_C 137.1, 127.9/ δ_H 5.53) and the hydroxy group at C-9 in **2** instead of the epoxide group between C-8 and C-9 and the hydroxy group at C-7 in **1** was deduced by COSY and HMBC experiments. Thus, the COSY of **2** revealed the presence of the C-8/C-10 spin system. Additionally, the HMBC correlations observed from the methyl group protons Me-18 to the C-7 and C-8 olefinic carbons, those between the oxymethine proton H-9 at δ_H 4.39 and the sp^2 methine carbon C-8 at δ_C 127.9, and the long-range correlations from the olefinic methine H-8 proton to the C-6 carbon indicated the presence of a Δ^7 double bond and a vicinal diol at C-9 and C-10 (Figure 5). The carbon and proton NMR chemical shifts of **2** proved to be similar to those of the xenican diterpenoids antheliatin and florxenilide A, having the same framework and oxygenated positions but differing in the substitution on the oxygen atoms. Antheliatin was isolated from *Anthelia glauca* and *Alryoniurn aureum*, two species belonging to different families of reef-inhabiting soft corals,⁷ while florxenilide A was obtained from the octocoral *Xenia florida*.⁸

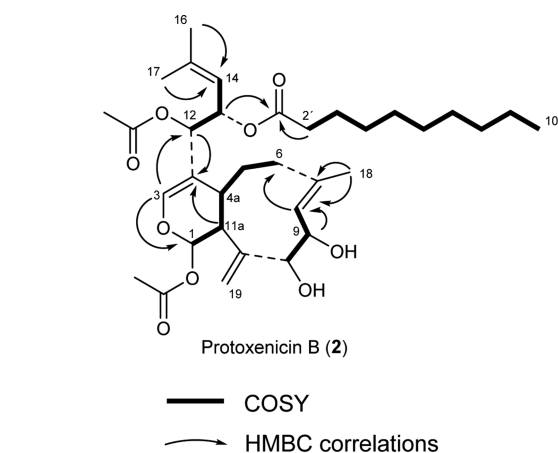


Figure 5. COSY correlations (displayed by bold bonds) and key HMBC (arrows) in **2**.

Similar to the case of **1**, the relative configuration of **2** was addressed once its planar structure was established. The $1R^*$, $4aS^*$, and $11aR^*$ relative configuration in the 1-acetoxidyhydropyran ring in **2** was deduced by comparison of its NMR spectroscopic data to those of compound **1** and antheliatin.⁷ The relative configuration of the stereogenic centers of the side chain in **2** was deduced by comparison to that of compound **1**. The large coupling constant $J_{H12,H13}$ of 6.2 Hz between H-12 and H-13 observed in the 1H NMR spectrum of **2** revealed the *anti* disposition of these protons. The similar J coupling constant values and proton and carbon chemical shifts for these positions in compounds **1** and **2** suggested the $12R^*$ and $13S^*$ relative configuration for these stereogenic centers in the side chain of **2**. Furthermore, the carbon chemical shifts of compound **2** at C-12 (δ_{C12} 74.9) and C-13 (δ_{C13} 70.7) are closer to those of havannahine (δ_{C12} 75.1 and δ_{C13} 69.6)⁹ and the havannachlorhydrins (δ_{C12} 76.4 and δ_{C13} 71.0)¹⁰ isolated from *Xenia membranacea*, which have the same relative configuration ($12R^*$ and $13S^*$). In contrast, antheliatin (δ_{C12} 71.6 and δ_{C13} 71.9),⁷ florxenilide (δ_{C12} 70.6 and δ_{C13} 71.5),⁸ and a xenican isolated from *Clavularia inflata* var. *luzoniana* (δ_{C12} 71.6 and δ_{C13} 70.7)¹¹ have opposite relative configuration $12S^*$ and $13R^*$.

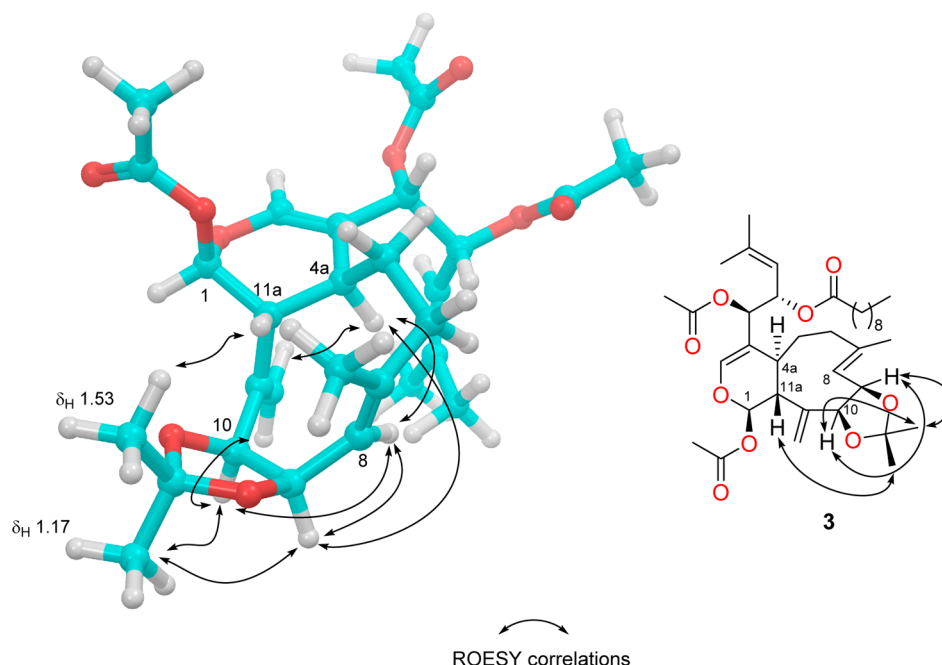


Figure 6. Key NOE correlations observed in the ROESY experiment of protoxenicin acetonide (**3**) displayed in the most stable conformer found by a conformational search (C3'–C10' omitted for clarity).

In order to determine the relative configuration of the 1,2-diol on the C-9 and C-10 carbons in compound **2**, the acetonide **3** was prepared by reaction of **2** in acetone with 2,2-dimethoxypropane. Surprisingly, the NMR spectroscopic data of the crude reaction showed the presence of a single set of chemical shift signals instead of the two sets seen for the starting product, and a detailed NMR analysis along with a conformational search of acetonide **3** was performed in order to establish the relative configuration of this compound.

The *E*-configuration of the Δ^7 double bond was suggested by the strong NOE correlation observed in the ROESY experiment of **3** between H-8/H-4a, which was confirmed by the lack of a NOE correlation between H-8 and H-18. The NOE correlations from H-10 to H-8, H-9, and H-19a and between H-8/H-9, H-19a/H-19b, and this in turn to H-4a located all of these protons on the same face of the molecule, which was assigned arbitrarily as α . On the other hand, the NOE correlation between H-11a and the methyl protons of the acetonide group at δ_{H} 1.53 located these protons on the other side of the molecule, assigned as β . The former NOE cross-peaks along with the NOE correlation between the oxymethine H-9 and H-10 protons and the same methyl protons of the acetonide group at δ_{H} 1.17 indicate the presence of a *syn*-1,2-diol acetonide in compound **3**. As in **1**, a conformer with a minimal energy of **3** obtained by conformational torsional sampling search using MacroModel/Monte Carlo multiple minimum explains the NOE correlations observed in its ROESY experiment (Figure 6). These NOE correlations were corroborated by selective 1D NOESY irradiation (see the Supporting Information). Therefore, the resulting relative configuration for protoxenicin acetonide (**3**) is 1*R**, 4*aS**, 9*R**, 10*S**, 11*aR**, 12*R**, and 13*S**.

These results led us to propose that compound **2** is actually present in solution as a mixture of two conformers. Unfortunately, no more samples were available to repeat the NMR spectra at higher temperatures in order to demonstrate such a conformational equilibrium. Although the three-

dimensional structure of each possible conformer could not be established, a comparison of the coupling constants and the chemical shift values in the NMR spectra of **2** for each of the two sets of NMR signals corresponding to each of the two components showed that the main differences are located around the C-1/C-4a/C-8/C-9/C-10/C-11a positions (Table S2). Table 2 summarizes the different coupling constant and

Table 2. Main Differences of the Proton Chemical Shifts and the *J* Values Detected between the Two Sets of Signals Observed in the ^1H NMR (500 MHz) Spectrum of Protoxenicin B (**2**) in CD_2Cl_2

major component		minor component	
position	δ_{H} , mult. (<i>J</i> in Hz)	position	δ_{H} , mult. (<i>J</i> in Hz)
1	5.71, d (5.7)	1	5.79, d (1.0)
4a	1.99, m	4a	2.04, m
8	5.53, d (10.8)	8	5.28, d (6.2)
9	4.39, dd (10.2, 3.7)	9	4.27, dd (6.2, 6.2)
10	4.34, d (3.7)	10	4.37, d (6.2)
11a	3.01, brs	11a	2.54, brs

chemical shift NMR values observed for H-1, H-8, H-9, and H-10 protons in each component. For example, H-9 resonates in the ^1H NMR spectrum of **2** as a doublet of doublets with *J* values of 10.2 and 3.7 Hz in the major component and appears as a double doublet with both *J* values of 6.2 Hz in the minor component (Figure 7). This information allowed us to propose that the main conformational differences between the two possible conformers of **2** must be located around those positions.

Cell proliferation assays against the human tumor cell lines NSLC A-549 (lung), HT-29 (colon), and MDA-MB-231 (breast) showed that both **1** and **2** exhibit significant cytotoxic activity, with GI_{50} values in the micromolar range (Table 3). As a positive standard the antitumor compound doxorubicin was

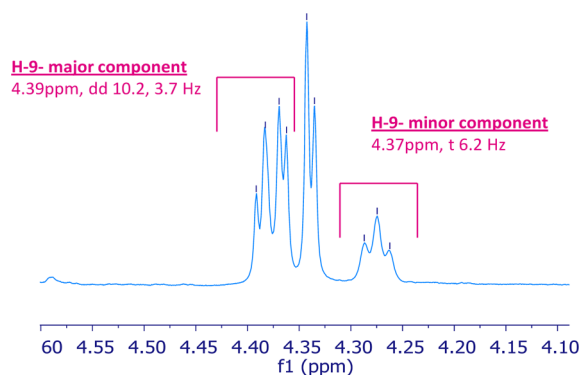


Figure 7. H-9 appearance in the ^1H NMR (500 MHz) of **2** in CD_2Cl_2 .

also tested in parallel following an identical procedure, and the results are included in Table 3.

Table 3. Cytotoxic Activity Data (μM) of **1** and **2**^a

compound		tumor cell lines		
		breast, MDA-MB-231	colon, HT-29	lung, NSCLC A-549
protoxenicin A (1)	GI ₅₀	2.1	0.6	1.1
	TGI	2.8	1.2	1.4
	LC ₅₀	3.8	2.2	1.8
protoxenicin B (2)	GI ₅₀	6.3	1.7	6.1
	TGI	9.7	5.2	10.1
	LC ₅₀	12.9	10.4	13.3
doxorubicin	GI ₅₀	0.2	0.3	0.2
	TGI	0.5	0.9	0.9
	LC ₅₀	2.4	>17.2	>17.2

^aGI₅₀, compound concentration that produces 50% inhibition on cell growth as compared to control cells, TGI, compound concentration that produces total growth inhibition as compared to control cells, and LC₅₀, compound concentration that produces 50% cell death as compared to control cells.

In summary, two new xenicanes, **1** and **2**, were isolated from the organic extract of the soft coral *P. repens*. This work represents the first chemical study of an organism belonging to the *Protodendron* genus. Although there is precedence of an acylated xenicin in xeniaethers D and E,¹² this is the first report of a xenicin acylated with a long saturated fatty acid. The presence of this long chain can improve the physical properties of these compounds, including the ability to partition into membranes because of their increased lipophilicity. An intense NMR analysis on compound **1** and the preparation of the acetonide derivative **3** from compound **2** allowed us to determine the relative configurations of **1** and **2**, respectively. Moreover, the application of Mosher's method in **1** allowed establishing the absolute configuration of the stereogenic centers of the cyclononane ring and at C-1. Furthermore, compound **2** seems to be present in solution as an equilibrium mixture of two conformers in a 2:1 ratio. Finally, these compounds showed significant cytotoxic activity against three human tumor cell lines.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Optical rotations were determined using a Jasco P-1020 polarimeter. UV spectra were performed using an Agilent 8453 UV-vis spectrometer. IR spectra were obtained with a PerkinElmer Spectrum 100 FT-IR spectrometer

with ATR sampling. NMR spectra were recorded on a Varian "Unity 500" spectrometer at 500/125 MHz ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$). Chemical shifts were reported in ppm using residual CH_2Cl_2 (δ_{H} 5.32 for ^1H and δ_{C} 54.0 for ^{13}C), C_6H_6 (δ_{H} 7.6 for ^1H and δ_{C} 128.1 for ^{13}C), and pyridine (δ_{H} 8.74, 7.58, 7.22 for ^1H and δ_{C} 150.35, 135.91, 123.87 for ^{13}C) as an internal reference. (+)-ESIMS spectra were recorded using an Agilent 1100 Series LC/MSD spectrometer. High-resolution mass spectroscopy (HRMS) was performed on an Agilent 6230 TOF LC/MS system using the ESIMS technique.

Animal Material. The soft coral *Protodendron repens* was collected by hand and traditional scuba diving off Okuza Island south of Tanzania (08°34.795' S/039°30.393' E) at depths ranging between 15 and 21 m in October 2007 and frozen immediately after collection. A voucher specimen (ORMAS1093) is deposited at PharmaMar.

Extraction and Isolation. A specimen of *Protodendron repens* (25 g) was triturated and exhaustively extracted with $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (50:50, 3 × 500 mL). The combined extracts were concentrated to yield a mass of 1.5 g, which was subjected to VLC on Lichroprep RP-18 (Merck KGaA) with a stepped gradient from H_2O to MeOH and then CH_2Cl_2 . The fraction eluting with MeOH (289 mg) was subjected to semipreparative HPLC (Waters Symmetry C_{18} , 7 μm , 7.8 × 150 mm, gradient from 80% to 90% CH_3CN in H_2O with 0.1% trifluoroacetic acid in 20 min, flow 2.8 mL/min, UV detection) to yield **1** (10 mg, retention time 8.8 min) and **2** (2 mg, retention time 13.5 min).

Conformational Searches. MacroModel (Schrödinger suite), as molecular mechanics software, was used with the Monte Carlo multiple minimum method and torsional sampling with an energy window at 3 kcal mol⁻¹.

Protoxenicin A (1): amorphous, colorless solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +41.9$ (c 0.85, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} 220 nm; IR (ATR) ν_{max} 3491, 2958, 2928, 2856, 1742, 1666, 1457, 1371, 1229, 1167, 1104, 1038, 1017, 966, 936, 916, 869, 811, 743 cm⁻¹; ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (125 MHz), Table 1; (+)-HRESI-TOFMS m/z 637.3615 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_{11}$, 637.3582).

Protoxenicin B (2): amorphous, colorless solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -5.5$ (c 0.83, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} 220 nm; IR (ATR) ν_{max} 3472, 2929, 2856, 1741, 1665, 1455, 1416, 1373, 1231, 1206, 1160, 1042, 959, 892, 838, 790 cm⁻¹; ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (125 MHz) Table 1; (+)-HRESI-TOFMS m/z 627.3531 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_9\text{Na}$, 627.3504).

Preparation of (S)-MTPA Ester of Protoxenicin A (1). R-(−)-MTPA chloride (5 μL) was added to a solution of **1** (1.5 mg) in 0.5 mL of pyridine- d_5 in an NMR tube. The resulting mixture was allowed to stand at room temperature (rt) for 7 h to yield the (S)-MTPA ester of **1** (**1a**), which was monitored by recording ^1H NMR spectra at 500 MHz.

Compound 1a: ^1H NMR (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ_{H} 6.63 (1H, d, J = 7.0 Hz, H-1), 5.50 (1H, s, H-19a), 5.43 (1H, s, H-19b), 4.28 (1H, brs, H-4a), 3.08 (1H, d, J = 4.3 Hz, H-8), 1.58 (3H, s, H-18); (+)-HRESI-TOFMS m/z 875.3869 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{59}\text{F}_3\text{O}_{13}\text{Na}$, 875.3808).

Preparation of (R)-MTPA Ester of Protoxenicin A (1). Treatment of **1** (1.5 mg) in the same manner as before with S-(+)-MTPA chloride (5 μL) gave the (R)-MTPA ester of **1** (**1b**).

Compound 1b: ^1H NMR (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ_{H} 6.64 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-1), 5.75 (1H, s, H-19a), 5.61 (1H, s, H-19b), 4.24 (1H, brs, H-4a), 3.03 (1H, d, J = 4.4 Hz, H-8), 1.55 (3H, s, H-18); (+)-HRESI-TOFMS m/z 875.3841 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{59}\text{F}_3\text{O}_{13}\text{Na}$, 875.3808).

Preparation of Acetonide 3.¹³ Compound **2** (1.5 mg) in anhydrous acetone (50 μL) was treated with 2,2-dimethoxypropane (200 μL) and 0.4 mg of 10-CSA (10-camphorsulfonic acid) at rt. The mixture was then stirred at rt until consumption of the starting material (TLC monitoring) for 3 h. After that time, Et_3N (0.75 μL) was added, and the mixture was concentrated under a nitrogen stream to obtain 1 mg of pure **3**: ^1H NMR (500 MHz, C_6D_6) δ 6.70 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-3), 6.48 (1H, d, J = 1.3 Hz, H-1), 6.15 (1H, dd, J = 9.4, 6.0 Hz, H-13), 5.74 (1H, d, J = 6.0 Hz, H-12), 5.36 (1H, s, H-19a), 5.08 (1H, s, H-19b), 5.01 (1H, d, J = 2.6 Hz, H-8), 4.75 (1H, dd, J = 7.9,

2.6 Hz, H-9), 4.48 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-10), 2.72 (1H, brd, $J = 1.3$ Hz, H-11a), 2.36 (1H, brs, H-4a), 2.29 m (1H, m, H-5a), 2.26 (1H, m, H-6a), 2.20 (2H, m, H-2'), 2.10 (3H, s, H-18), 1.85 (1H, m, H-5b), 1.76 (3H, s, H-17), 1.71 (3H, s, OAc-12), 1.61 (3H, s, OAc-1), 1.58 (3H, s, H-16), 1.53 (3H, s, acetone-CH₃ (2)), 1.57 (2H, m, H-3'), 1.22 (12H, m, H-4'-9'), 1.17 (3H, s, acetone-CH₃ (1)), 0.90 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-10'); ¹³C NMR (125 MHz, C₆D₆) δ 172.5 (C-1'), 169.2 (OAc-1), 169.5 (OAc-12), 149.8 (C-11), 143.0 (C-3), 139.9 (C-7), 139.9 (C-15), 121.0 (C-8), 120.3 (C-14), 118.5 (C-19), 114.5 (C-4), 109.5 (acetone), 92.1 (C-1), 84.6 (C-10), 78.3 (C-9), 75.7 (C-12), 70.6 (C-13), 43.9 (C-6), 42.6 (C-11a), 40.8 (C-4a), 34.6 (C-2'), 29.8–29.4 (C-4'-9'), 29.1 (C-5), 25.9 (C-16), 25.8 (acetone-CH₃ (2)), 25.2 (C-3'), 23.1 (acetone-CH₃ (1)), 20.8 (CH₃-OAc₁₂), 20.3 (CH₃-OAc₁), 18.8 (C-17), 18.6 (C-18), 14.4 (C-10'); (+)-HRESI-TOFMS m/z 667.3863 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₇H₅₆O₉Na, 667.3817).

Biological Assays. The cytotoxic activities of compounds **1** and **2** were tested against A-549 human lung carcinoma cells, MDA-MB-231 human breast adenocarcinoma cells, and HT-29 human colorectal carcinoma cells. The concentration giving 50% inhibition of cell growth (GI₅₀) was calculated according to the procedure described in the literature.¹⁴ Cell survival was estimated using the National Cancer Institute (NCI) algorithm.¹⁵ Three dose–response parameters were calculated for **1** and **2**.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00046.

¹H, ¹³C, HSQC, COSY, HMBC, and ROESY NMR spectra of **1**, **2**, and **3** and the ¹H spectra of (R)- and (S)-MTPA esters of **1** (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: mperez@pharmamar.com.

*E-mail: carlos.jimenez@udc.es. Tel: +34 981 167000. Fax: +34 981 167065.

ORCID

Jaime Rodríguez: 0000-0001-5348-6970

Carlos Jiménez: 0000-0003-2628-303X

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the help of our PharmaMar colleagues C. de Eguilior and S. Bueno for collecting the marine samples, L. F. García for the design of the biological assays, S. Munt for revision of the manuscript, and S. González for performing the MS experiments. We also thank Dra. S. Soto (Facultad Ciencias del Mar, Universidad de Vigo, Spain) for determining the soft coral taxonomy. We also acknowledge Mr. P. J. Ruysenaars, The Pemba Channel Fishing Club, Ministry of Livestock and Fisheries Development, Fisheries Department (Tanzania).

■ DEDICATION

Dedicated to Professor Phil Crews, of the University of California, Santa Cruz, for his pioneering work on bioactive natural products.

■ REFERENCES

(1) Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629–661.

(2) Elshamy, A. I.; Nassar, M. I. *J. Biol. Act. Prod. Nat.* **2015**, *5*, 78–107.

(3) Huber, T.; Weisheit, L.; Magauer, T. *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 2521–2539.

(4) (a) Anta, C.; González, N.; Santafé, G.; Rodríguez, J.; Jiménez, C. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 766–768. (b) Anta, C.; González, N.; Rodríguez, J.; Jiménez, C. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1357–1359.

(5) Tanaka, J.; Ogawa, N.; Liang, J.; Higa, T.; deNys, R.; Bowden, B. F.; Carroll, A. R.; Coil, J. C.; Bernardinelli, G.; Jefford, C. W. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 9989–9996.

(6) Hoyer, T. R.; Jeffrey, C. S.; Shao, F. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2451–2458.

(7) Rudi, A.; Golberg, I.; Stein, Z.; Kashman, Y. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1581–1586.

(8) Cheng, Y.; Jang, J.; Khalil, A. T.; Kuo, Y.; Shen, Y.; Two, A. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 675–678.

(9) Lelong, H.; Ahond, A.; Chiaroni, A.; Poupat, C.; Riche, C.; Potier, P.; Pusset, J.; Pusset, M.; Laboute, P.; Menou, J. L. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 203–210.

(10) Almourabit, A.; Ahond, A.; Chiaroni, A.; Poupat, C.; Riche, C.; Potier, P.; Laboute, P.; Menou, J. L. *J. Nat. Prod.* **1987**, *51*, 282–292.

(11) Wang, S.-K.; Huang, M.-J.; Duh, C.-Y. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1411–1416.

(12) Iwagawa, T.; Amano, Y.; Okamura, H.; Nakatani, M.; Hase, T. *Heterocycles* **1996**, *43*, 1271–1277.

(13) Tianto, A. T.; Hermawan, I. H.; de Voogd, N. J.; Tanaka, J. T. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *59*, 1311–1313.

(14) Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107–1112.

(15) Shoemaker, R. H. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 813–823.